

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
(ФГБОУ ВО «ВГУ»)**

**На правах рукописи**

Руденко Татьяна Сергеевна

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

1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
д.б.н., проф. Грабович  
Маргарита Юрьевна

Воронеж — 2026

## Оглавление

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ВВЕДЕНИЕ .....                                                                                                                                              | 5  |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....                                                                                                                              | 13 |
| 1.1 Распространение представителей семейства <i>Beggiatoaceae</i> .....                                                                                     | 13 |
| 1.2 Морфология представителей семейства <i>Beggiatoaceae</i> .....                                                                                          | 15 |
| 1.3 Таксономия семейства <i>Beggiatoaceae</i> .....                                                                                                         | 18 |
| 1.4 Метаболизм соединений серы .....                                                                                                                        | 23 |
| 1.4.1 Диссимиляционное окисление соединений серы .....                                                                                                      | 23 |
| 1.4.1.1 Окисление сульфида .....                                                                                                                            | 23 |
| 1.4.1.2 Окисление тиосульфата .....                                                                                                                         | 25 |
| 1.4.1.3 Накопление и химический состав внутриклеточной серы .....                                                                                           | 27 |
| 1.4.1.4 Дальнейшее окисление запасенной серы .....                                                                                                          | 28 |
| 1.4.1.5 Окисление сульфита до сульфата .....                                                                                                                | 29 |
| 1.4.2 Восстановление элементной серы и тиосульфата.....                                                                                                     | 31 |
| 1.4.3 Персульфиддигидрогеназы и возможная роль в метаболизме серы у <i>Beggiatoaceae</i> ..                                                                 | 32 |
| 1.4.4 Белки оболочки серных глобул Sgr .....                                                                                                                | 36 |
| 1.5 Углерод, азот и другие направления метаболизма.....                                                                                                     | 39 |
| 1.5.1 Метаболизм углерода .....                                                                                                                             | 39 |
| 1.5.2 Метаболизм соединений азота.....                                                                                                                      | 41 |
| 1.6 Дыхательная цепь и другие доноры и акцепторы электронов .....                                                                                           | 42 |
| 1.7 Заключение по обзору литературы .....                                                                                                                   | 43 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....                                                                                                               | 45 |
| 2.1 Объект исследования.....                                                                                                                                | 45 |
| 2.2 Состав питательных сред .....                                                                                                                           | 45 |
| 2.3 Протеомный анализ .....                                                                                                                                 | 46 |
| 2.3.1 Протеомный анализ при исследовании белков оболочки серных глобул .....                                                                                | 46 |
| 2.3.1.1 Подготовка образцов для двумерного гель-электрофореза .....                                                                                         | 46 |
| 2.3.1.2 Двумерный гель-электрофорез.....                                                                                                                    | 46 |
| 2.3.1.3 Подготовка белковых пятен для анализа методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной tandemной масс-спектрометрией.. | 47 |
| 2.3.1.4 Идентификация белков методом MALDI-TOF/TOF-MS.....                                                                                                  | 47 |
| 2.3.1.5 Обработка масс-спектрометрических данных.....                                                                                                       | 48 |
| 2.3.1.6 Подготовка образцов для высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС).....                    | 49 |
| 2.3.1.7 Анализ методом ВЭЖХ-МС/МС .....                                                                                                                     | 49 |
| 2.3.1.8 Обработка данных протеомного анализа .....                                                                                                          | 50 |

|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.2 Протеомный анализ при исследовании превращения внутриклеточной элементной серы <i>B. leptomitiformis</i> D-402.....                                            | 50 |
| 2.3.2.1 Подготовка образцов для ВЭЖХ-МС/МС .....                                                                                                                     | 51 |
| 2.3.2.2 Анализ методом ВЭЖХ-МС/МС .....                                                                                                                              | 51 |
| 2.3.2.3 Обработка данных протеомного анализа .....                                                                                                                   | 52 |
| 2.4 Исследование персульфиддиоксигеназы PDO.....                                                                                                                     | 52 |
| 2.4.1 Получение рекомбинантного белка PDO.....                                                                                                                       | 52 |
| 2.4.1.1 Клонирование гена <i>pdoI</i> .....                                                                                                                          | 52 |
| 2.4.1.2 Рекомбинантная экспрессия и очистка.....                                                                                                                     | 53 |
| 2.4.2 Функциональная характеристика рекомбинантного PDO .....                                                                                                        | 54 |
| 2.4.2.1 Определение активности PDO .....                                                                                                                             | 54 |
| 2.4.2.2 Биохимические характеристики PDO.....                                                                                                                        | 55 |
| 2.4.3 Структурный анализ рекомбинантного PDO .....                                                                                                                   | 55 |
| 2.4.3.1 Кристаллизация .....                                                                                                                                         | 55 |
| 2.4.3.2 Кристаллография .....                                                                                                                                        | 56 |
| 2.5 Анализ экспрессии генов .....                                                                                                                                    | 57 |
| 2.6 Количественное определение тиосульфата и сульфата .....                                                                                                          | 59 |
| 2.7 Секвенирование и полировка геномов штаммов D-401 и D-402 .....                                                                                                   | 60 |
| 2.8 Исследование природных серных матов и получение MAG.....                                                                                                         | 60 |
| 2.8.1 Отбор проб и физико-химическая характеристика мест отбора .....                                                                                                | 60 |
| 2.8.2 Микроскопический анализ природных серных матов.....                                                                                                            | 61 |
| 2.9 Метагеномное секвенирование и сборка MAG .....                                                                                                                   | 61 |
| 2.10 Геномный и филогенетический анализ .....                                                                                                                        | 62 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....                                                                                                                               | 64 |
| 3.1 Установление причины утраты способности к накоплению внутриклеточной элементной серы у штамма <i>B. leptomitiformis</i> D-401.....                               | 64 |
| 3.1.1 Уточнение геномных последовательностей и сравнительный анализ генов диссимиляционного метаболизма серы у штаммов <i>B. leptomitiformis</i> D-401 и D-402 ..... | 64 |
| 3.1.2 Сравнение полных геномов штаммов D-401 и D-402 .....                                                                                                           | 67 |
| 3.1.3 Выявление генов-кандидатов, нарушенных транспозонными вставками в геноме штамма D-401 .....                                                                    | 72 |
| 3.1.4 Протеомный анализ штаммов <i>B. leptomitiformis</i> D-401 и D-402.....                                                                                         | 73 |
| 3.1.4.1 Сравнение протеомных карт штаммов <i>B. leptomitiformis</i> D-401 и D-402 .....                                                                              | 74 |
| 3.1.4.2 Идентификация белков-кандидатов методами MALDI-TOF/TOF-MS и ВЭЖХ-МС/МС .....                                                                                 | 74 |
| 3.1.5 Влияние тиосульфата на экспрессию генов-кандидатов у штамма D-402.....                                                                                         | 76 |
| 3.1.6 Сравнительный анализ экспрессии генов Sox-системы у штаммов D-401 и D-402. ....                                                                                | 77 |

|                                                                                                                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2 Выяснение путей превращения элементарной серы у <i>B. leptomitiformis</i> D-402 .....                                                                                               | 79  |
| 3.2.1 Поиск и филогенетический анализ предполагаемой персульфиддиоксигеназы .....                                                                                                       | 79  |
| 3.2.2 Протеомный анализ штамма D-402 при использовании внутриклеточной<br>элементарной серы.....                                                                                        | 83  |
| 3.2.3 Клонирование гена <i>pdo</i> , получение рекомбинантной персульфиддиоксигеназы и<br>характеристика ее физико-химических свойств .....                                             | 84  |
| 3.2.4 Структура персульфиддиоксигеназы <i>B. leptomitiformis</i> .....                                                                                                                  | 89  |
| 3.2.5 Количественный анализ экспрессии генов <i>pdo</i> и <i>soxAXBYZ</i> .....                                                                                                         | 93  |
| 3.2.6 Промежуточные продукты, выявленные при культивировании <i>B. leptomitiformis</i><br>D-402 на обедненной минеральной среде в присутствии внутриклеточной элементарной<br>серы..... | 95  |
| 3.3 Филогенетическое положение и метаболический потенциал новых представителей<br>семейства <i>Beggiatoaceae</i> .....                                                                  | 99  |
| 3.3.1 Характеристика биотопа.....                                                                                                                                                       | 100 |
| 3.3.2 Морфология нитчатых бесцветных сероокисляющих бактерий из серных матов .                                                                                                          | 102 |
| 3.3.3 Сборка MAG представителей семейства <i>Beggiatoaceae</i> .....                                                                                                                    | 104 |
| 3.3.4 Филогенетический анализ MAG <i>Beggiatoaceae</i> sp. WS_Bin1.....                                                                                                                 | 105 |
| 3.3.5 Филогенетический анализ MAG <i>Beggiatoaceae</i> sp. WS_Bin3.....                                                                                                                 | 107 |
| 3.3.6 Геномный анализ основных метаболических путей представителей рода<br>“ <i>Ca. Parabeggiatoa</i> ” .....                                                                           | 109 |
| 3.3.7 Геномный анализ основных метаболических путей представителей нового рода<br>“ <i>Ca. Albibeggiatoa</i> ” .....                                                                    | 114 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....                                                                                                                                                                         | 117 |
| ВЫВОДЫ .....                                                                                                                                                                            | 119 |
| Список сокращений.....                                                                                                                                                                  | 121 |
| Список литературы.....                                                                                                                                                                  | 122 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ .....                                                                                                                                                                        | 139 |

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Бесцветные сероокисляющие бактерии семейства *Beggiatoaceae*, относящиеся к типу *Pseudomonadota*, классу *Gamma proteobacteria*, 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 leptomitiformis* и *Thioflexithrix pseukupensis* (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. leptomitiformis* D-401 и D-402<sup>T</sup>. 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. leptomitiformis*, 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 leptomitiformis*, а также сравнительный филогеномный анализ представителей семейства *Beggiatoaceae*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить геномные различия между штаммами *B. leptomitiformis* 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. leptomitiformis* D-401 к накоплению внутриклеточной элементной серы.
3. Установить возможный механизм превращения внутриклеточной элементной серы у *B. leptomitiformis* 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. leptomitiformis* 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. leptomitiformis* 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. leptomitiformis* D-401.
2. Персульфиддиоксигеназа играет ключевую роль в окислении внутриклеточной элементной серы у *B. leptomitiformis* 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. leptomitiformis* D-402 относится к персульфиддиоксигеназам I типа семейства металло- $\beta$ -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 мультikonференции «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. leptomitiformis* 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. Скрыбина, 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).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Распространение представителей семейства *Beggiatoaceae*

Представители семейства *Beggiatoaceae* встречаются в зонах выраженных редокс-градиентов, где восстановленные соединения серы поступают из восстановленной зоны, а акцепторы электронов — из более окисленной. Такие условия возникают при разложении органического вещества в продуктивных шельфовых системах, выходе восстановленных флюидов, анаэробном окислении метана, на разлагающемся растительном материале и в областях подводной вулканической активности (Fossing *et al.*, 1995; Schulz *et al.*, 1999; Grünke *et al.*, 2012; Danovaro *et al.*, 2017; Volland *et al.*, 2022).

Среди представителей семейства *Beggiatoaceae* известны пресноводные формы, обнаруженные в донных осадках озер и других водоемов, а также в сульфидных источниках. К культивируемым пресноводным представителям относится *Beggiatoa alba*, для которой изучены штаммы B18LD<sup>T</sup> и B15LD (Strohl, Larkin, 1978; Mezzino *et al.*, 1984; Ahmad *et al.*, 2006), и *Beggiatoa leptomitiformis*, выделенная из загрязненного пресноводного источника в Московской области (Dubinina *et al.*, 2017). Еще один пресноводный культивируемый представитель, *Thioflexithrix pseukupensis*, выделен из сульфидного источника в городе Горячий Ключ (Gureeva *et al.*, 2019). Представители рода *Thioploca* обнаружены в осадках пресноводных озер Европы, Японии и Байкала (Kojima *et al.*, 2003; Zemskaya *et al.*, 2009). Вид *Thioploca ingrlica* исследован в донных осадках озера Окотанпэ в Японии (Kojima *et al.*, 2015). Близкие формы выявлены в бухте Фролиха на озере Байкал (Zemskaya *et al.*, 2009), в районе холодного метанового сипа Посольская банка (Chernitsyna *et al.*, 2016) и в богатых органическим веществом осадках мелководья Селенги (Chernitsyna *et al.*, 2026).

В Перуано-Чилийской системе апвеллинга представители “*Candidatus Marithioploca*” образуют обширные сообщества на шельфе (Maier, Gallardo, 1984; Fossing *et al.*, 1995; Salman *et al.*, 2011). Наибольшая биомасса этих бактерий отмечена в обедненной кислородом части шельфа; на участках с более высоким содержанием кислорода она снижается (Gómez *et al.*, 2024). Представители этой линии обнаружены также в сульфидных осадках Намибийского шельфа и залива Консепсьон (Flood *et al.*, 2021; Fonseca *et al.*, 2025). *Thiomargarita namibiensis* образует плотные популяции в осадках Намибийского шельфа, расположенного в пределах

Бенгельской системы апвеллинга (Schulz *et al.*, 1999; Flood *et al.*, 2021). В обеих системах апвеллинга интенсивное развитие фитопланктона приводит к поступлению большого количества органического вещества в донные осадки (Smith *et al.*, 1983; Flood *et al.*, 2021). При его микробном разложении расходуется кислород, а в анаэробных слоях осадка сульфатредукция приводит к образованию сульфида (Ferdelman *et al.*, 1997; Flood *et al.*, 2021). “*Candidatus Thiomargarita magnifica*” обнаружена на разлагающихся листьях красного мангра в Гваделупе. Это отличает ее местообитание от шельфовых осадков, характерных для *T. namibiensis* (Volland *et al.*, 2022).

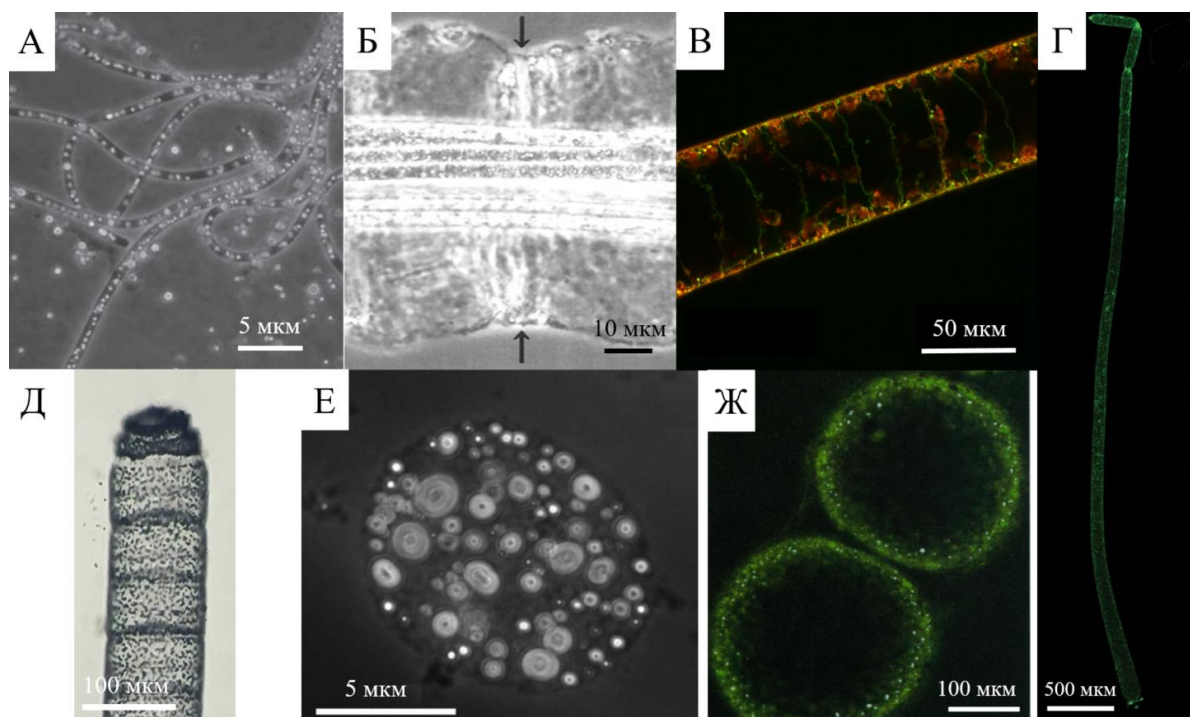
“*Candidatus Maribeggiatoa*” встречается в восстановленных осадках Монтерейского каньона, Гуаймасского бассейна и Намибийского шельфа. Эти районы различаются по происхождению сульфида, который образуется в холодных сипах, гидротермально измененных осадках или продуктивных шельфовых системах (Ahmad *et al.*, 1999; Salman *et al.*, 2011; MacGregor *et al.*, 2013b; Flood *et al.*, 2021). Прикрепленная “*Candidatus Marithrix*” обнаружена у мелководных гидротермальных выходов на побережье Калифорнии, где нити на твердых субстратах попеременно контактируют с сульфидной и насыщенной кислородом морской водой (Kalanetra *et al.*, 2004; Salman *et al.*, 2011).

“*Candidatus Thiopilula*” обнаружена в двух различающихся типах сульфидных осадков: на Намибийском шельфе под продуктивными водами с низким содержанием кислорода (Salman *et al.*, 2011) и на глубоководных холодных сипах Барбадосского аккреционного комплекса, где образование сульфида связано с выходом восстановленных флюидов (Jones *et al.*, 2015). “*Candidatus Thiophysa*”, напротив, пока надежно известна только из осадков Намибийского шельфа (Salman *et al.*, 2011). “*Candidatus Halobeggiatoa*” также связана с холодными сипами, но обнаружена в Баренцевом море при температурах, близких к точке замерзания морской воды; сульфид здесь образуется преимущественно вследствие анаэробного окисления метана (Grünke *et al.*, 2012). Родственная линия выявлена в сульфидных осадках центрального Чили (Fonseca *et al.*, 2025). Иной вариант распространения характерен для “*Candidatus Thiolava veneris*”, образующей белые бактериальные маты на молодых вулканических отложениях подводного вулкана Тагоро, куда восстановленные соединения поступали вследствие гидротермальной активности после извержения (Danovaro *et al.*, 2017).

Представители “*Candidatus Isobeggiatoa*” и “*Candidatus Parabeggiatoa*” обнаружены в органически обогащенных прибрежных осадках Ваттового моря и Лимффорда, где свободный сульфид появляется ниже поверхностного окисленного слоя (Mußmann *et al.*, 2003; Salman *et al.*, 2011). Для “*Ca. Isobeggiatoa*” связь с органическим обогащением осадков подтверждена также в южном Чили, однако там оно обусловлено деятельностью аквакультуры (Aranda *et al.*, 2026). Представители рода “*Candidatus Allobeggiatoa*” отличаются приуроченностью к гиперсоленым микробным матам Мексики и Испании, в которых высокая соленость сочетается с выраженными суточными изменениями распределения кислорода и сульфида (Hinck *et al.*, 2007; Hinck *et al.*, 2011). Вид “*Candidatus Venteria ishoyei*” также связан с органически обогащенными восстановленными осадками, но обнаружен в продуктивной системе апвеллинга залива Консепсьон у центрального побережья Чили (Fonseca *et al.*, 2017; Fonseca *et al.*, 2025).

## 1.2 Морфология представителей семейства *Beggiatoaceae*

Морфология представителей семейства *Beggiatoaceae* отличается исключительной вариабельностью. Семейство объединяет тонкие однорядные трихомы диаметром около 1,5–3 мкм, широкие вакуолизированные нити диаметром более 100 мкм, сферические клетки размером в сотни микрометров и гигантские одиночные клетки нитевидной формы, достигающие 2 см в длину (Strohl, Larkin, 1978; McHatton *et al.*, 1996; Schulz *et al.*, 1999; Schutte *et al.*, 2018; Volland *et al.*, 2022) (Рисунок 1). Различия между этими формами важны не только как диагностические признаки: они отражают разные способы доступа к пространственно разделенным субстратам и окислителям. Подвижные трихомы могут менять положение в осадке, тогда как увеличение клеточных размеров и развитие внутренних резервуаров позволяют накапливать вещества, поступающие из разных зон или доступные в разное время (Teske, Salman, 2014; Flood *et al.*, 2021).



**Рисунок 1 — Основные морфотипы, представленные в семействе *Beggiatoaceae***

**А** — *T. pseukupensis* D3<sup>T</sup> из серного источника Горячий Ключ, Россия — свободные тонкие нити. Клетки объединены в трихомы. Фазово-контрастная микроскопия (цит. по Gureeva, Grabovich, 2021). **Б** — *Thioploca* из озера Бива, Япония — пучки трихом в общем слизистом чехле. Трихомы содержат многочисленные включения серы; стрелками отмечено сужение слизистого чехла. Фазово-контрастная микроскопия (цит. по Kojima *et al.*, 2003). **В** — Широкие белые *Beggiatoaceae* из бассейна Гуаймас, Мексика — свободные широкие вакуолизированные нити. Периферически расположены цитоплазма и липидные структуры, крупная неокрашенная центральная область соответствует водной вакуоли, занимающей большую часть объема клетки. Флуоресцентная микроскопия после комбинированного окрашивания флуоресцеинизотиоцианатом и Nile Red (цит. по Schutte *et al.*, 2018). **Г** — “*Ca. Thiomargarita magnifica*” из мангровых местообитаний Гваделупы — гигантская одиночная нитевидная клетка. Показана непрерывная гигантская клетка от базального полюса до сужения в апикальной части. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия после флуоресцентного окрашивания мембран FM 1-43X (цит. по Volland *et al.*, 2022). **Д** — “*Candidatus Marithrix*” sp. из района Green Canyon 246, Мексиканский залив — крупная прикрепленная многоклеточная нить. Нить образована крупными дисковидными клетками; дифференцированно сегментированный конец рассматривается авторами как возможная прикрепительная структура. Световая микроскопия (цит. по Salman-Carvalho *et al.*, 2016). **Е** — “*Candidatus Thiopilula*” spp. из холодного сипа Манон (Барбадосская аккреционная призма) — мелкие сферические клетки. В клетках видны внутриклеточные включения элементной серы. Фазово-контрастная микроскопия (цит. по Jones *et al.*, 2015). **Ж** — *T. namibiensis* из шельфовых осадков у побережья Намибии — крупные сферические клетки, образующие цепочки. Цитоплазма окрашена флуоресцеинизотиоцианатом в зеленый цвет, белым отображается рассеянный свет серных глобул; большая часть объема клетки занята крупной центральной вакуолью. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (цит. по Schulz *et al.*, 1999).

К тонким культивируемым нитчатым формам относятся *B. alba*, *B. leptomitiformis* и *T. pseukupensis* (Strohl, Larkin, 1978; Dubinina *et al.*, 2017; Gureeva *et al.*, 2019). У *B. alba* и *B. leptomitiformis* трихомы не заключены в общий слизистый

чехол и способны к скользящему движению (Strohl, Larkin, 1978; Dubinina *et al.*, 2017). В экспериментально созданных градиентах *Beggiatoa* spp. меняли положение относительно распределения кислорода и сульфида (Nelson *et al.*, 1986). Такая подвижность позволяет сохранять благоприятное положение при смещении химических зон, хотя конкретные механизмы ориентации могут различаться у разных представителей (Teske, Salman, 2014). *T. psekiensis* также образует однорядные трихомы, способные к скользящему движению. При культивировании они выделяют слизь и образуют слизистые скопления (Gureeva *et al.*, 2019).

У представителей рода *Thioploca* многочисленные трихомы объединены в пучки, окруженные общим слизистым чехлом. Отдельные трихомы могут независимо перемещаться внутри него, а сам слизистый чехол часто ориентирован вертикально в осадке. Эта организация может обеспечивать перемещение трихомов между поверхностными слоями, содержащими кислород или нитрат, и расположенной глубже сульфидной зоной. Вертикальная миграция позволяет трихомам достигать пространственно разнесенных зон, содержащих окислители и сульфид, и снижает их зависимость от диффузии этих соединений (Huettel *et al.*, 1996).

Иной вариант морфологической адаптации к пространственной и временной изменчивости условий представлен рядом крупных вакуолизированных форм, способных накапливать нитрат во внутриклеточной вакуоли. У широких морских нитчатых форм и *T. namibiensis* центральная вакуоль занимает большую часть объема клетки, оставляя метаболически активную цитоплазму в виде тонкого периферического слоя. Такая организация позволяет значительно увеличивать размеры клетки без пропорционального увеличения объема цитоплазмы и формирует вместительный резервуар для нитрата (McHatton *et al.*, 1996; Schulz *et al.*, 1999; Schutte *et al.*, 2018). У морских представителей рода *Thioploca* обнаружена крупная вакуоль, занимающая более 80 % объема клетки и содержащая до 500 мМ нитрата. Для этих бактерий также показаны перенос запасенного нитрата при вертикальном перемещении трихомов и его последующее восстановление в сульфидной зоне осадка (Fossing *et al.*, 1995).

Вакуолизированная организация не ограничивается крупными нитчатыми и гигантскими сферическими формами. У сравнительно небольших сферических клеток кандидного рода “*Candidatus Thiopilula*” также описана центральная вакуоль (Jones

*et al.*, 2015). Однако содержимое этой вакуоли непосредственно не исследовали. Поэтому считать ее нитратным резервуаром только на основании морфологического сходства с другими вакуолизированными представителями *Beggiatoaceae* нельзя.

Крайний вариант клеточного гигантизма и усложнения внутренней организации представлен “*Ca. Thiomargarita magnifica*”. Ее одиночные нитевидные клетки могут достигать 2 см в длину и видимы невооруженным глазом. Генетический материал и рибосомы у этого вида заключены в многочисленные мембранные компартменты. Это отличает “*Ca. Thiomargarita magnifica*” от большинства известных бактерий и показывает, насколько далеко в пределах семейства может заходить структурная перестройка гигантской клетки (Volland *et al.*, 2022).

Многие представители *Beggiatoaceae* также образуют внутриклеточные включения элементной серы, количество которых изменяется в зависимости от доступности восстановленных соединений серы и окислителей (Winogradsky, 1887; Nelson, Castenholz, 1981; Schutte *et al.*, 2018; Flood *et al.*, 2021). Их состав, локализация и последующее окисление рассматриваются отдельно.

### 1.3 Таксономия семейства *Beggiatoaceae*

Систематика *Beggiatoaceae* исторически осложнялась несоответствием морфологического и филогенетического разнообразия. Семейство объединяет свободные и собранные в пучки нити, крупные сферические формы и гигантские одиночные клетки. Размеры клеток, строение трихомов, скользящее движение, вакуолизация и наличие включений элементной серы удобны для описания морфотипов, но не всегда отражают эволюционное родство. В современной формальной классификации *Beggiatoaceae* относится к порядку *Beggiatoales* класса *Gammaproteobacteria*; состав семейства и номенклатурный статус его таксонов отражены в базе LPSN (англ. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature) (<https://lpsn.dsmz.de/family/Beggiatoaceae>, дата обращения: 19.06.2026).

Дополнительную трудность создает неодинаковая обеспеченность различных линий таксономическими данными. Для одних представителей доступны чистые культуры и полногеномные последовательности, тогда как другие известны только по природному материалу, последовательностям гена 16S рРНК, геномным данным отдельных клеток или нитей либо геномам, собранным из метагеномов (MAG; англ. metagenome-assembled genomes). В результате значительная часть разнообразия

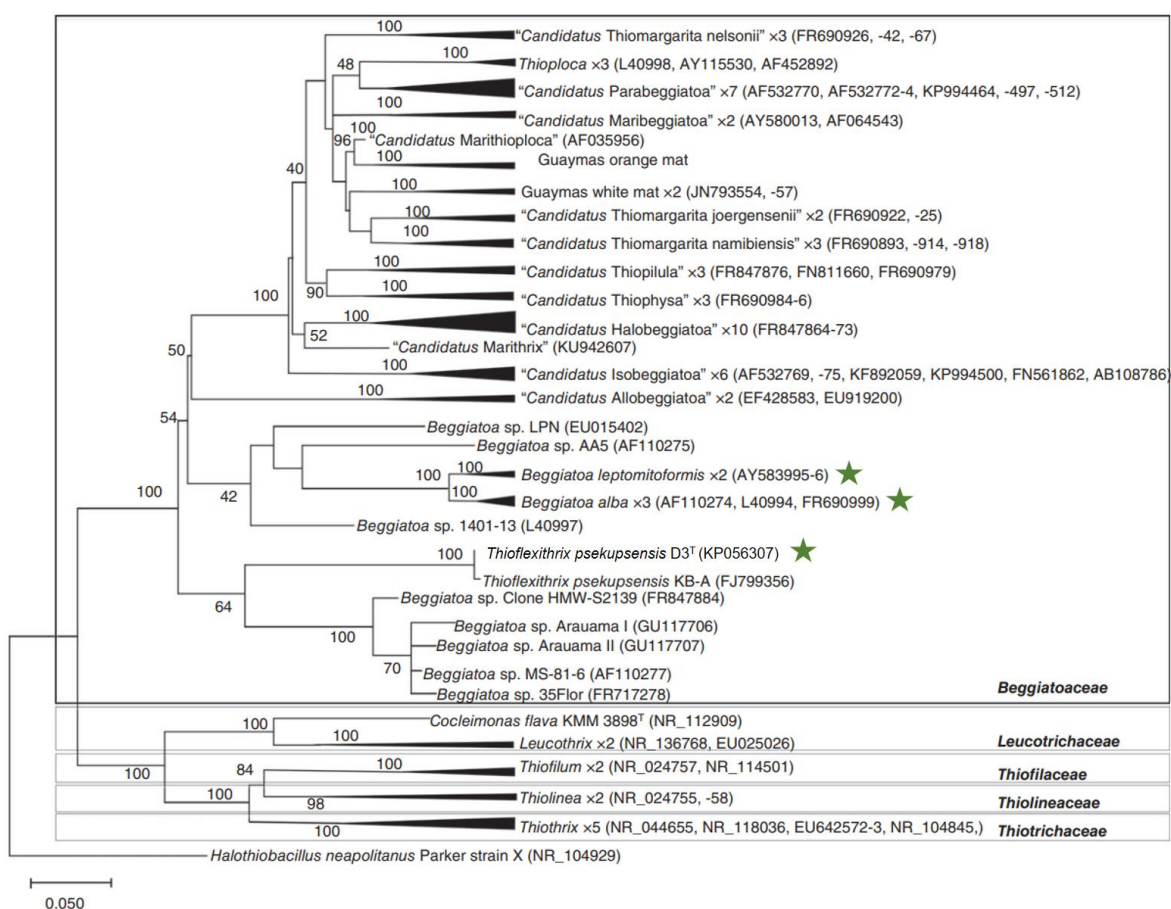
семейства остается представленной преимущественно молекулярными и геномными данными, а исторические названия *Beggiatoa* и *Thioploca*, широко применявшиеся к организмам определенного морфотипа, не всегда соответствуют современным филогенетическим границам родов (Salman *et al.*, 2011; Salman *et al.*, 2013).

Ранняя систематика опиралась на непосредственно наблюдаемые признаки. Род *Beggiatoa*, восходящий к описанной как *Oscillatoria alba* нитчатой форме, был установлен Trevisan в 1842 г.; позднее *B. alba* стала типовым видом рода, а род *Beggiatoa* — типовым родом семейства *Beggiatoaceae*, предложенного Migula в 1894 г. (Trevisan, 1842; Migula, 1894). Бесцветные скользящие трихомы классифицировали по форме и диаметру клеток, характеру движения и способности накапливать серу, поэтому название *Beggiatoa* применялось к широкому кругу внешне сходных организмов.

Ограничения морфологического подхода проявились и при разграничении *Beggiatoa* и *Thioploca*. Род *Thioploca* выделяли по пучкам подвижных трихомов в общем слизистом чехле, а виды различали преимущественно по диаметру трихомов. В седьмом издании Bergey's Manual самостоятельность рода *Thioploca* считалась сомнительной, поскольку отдельные трихомы описанных *Thioploca* соответствовали морфологии разных видов *Beggiatoa* (Buchanan, 1957). Виды *T. ingraca*, *Thioploca araucae* и *Thioploca chileae* позднее были описаны из природного материала без получения чистых культур (Maier, 1984; Maier, Gallardo, 1984). Историческое включение *Thiothrix* в *Beggiatoaceae* служит еще одним примером ограничений морфологической классификации (Garrity *et al.*, 2005).

Переход к молекулярной систематике изменил представления о границах семейства. Анализ 5S рРНК показал, что морфологически сходные сероокисляющие бактерии не образуют единой естественной группы (Stahl *et al.*, 1987). Исследования 16S рРНК установили родство *Thioploca* с *B. alba* и родственными нитчатыми серобактериями, одновременно выявив несоответствие между традиционными родовыми признаками и молекулярной филогенией (Teske *et al.*, 1995). Широкая вакуолизированная морская нить, определенная по морфологии как *Beggiatoa*, оказалась близка к *Thioploca* (Ahmad *et al.*, 1999), тогда как резко отличающаяся сферическими клетками *T. namibiensis* также вошла в близкую к морским *Thioploca* линию (Schulz *et al.*, 1999). Нитрат-аккумулирующие морские организмы,

обозначавшиеся как *Beggiatoa*, включали несколько филогенетических линий (Mußmann *et al.*, 2003), а культивируемые невакуолизированные *Beggiatoa* заняли базальное положение относительно разнообразных некультивируемых вакуолизированных форм (Ahmad *et al.*, 2006). Филогения по гену 16S рРНК наглядно демонстрирует несоответствие между историческими морфологическими обозначениями и филогенетическим положением отдельных представителей *Beggiatoaceae* (Рисунок 2).



**Рисунок 2 — Филогенетическое положение представителей семейства *Beggiatoaceae* на основании последовательностей гена 16S рРНК**

Дерево построено методом максимального правдоподобия; значения у узлов соответствуют bootstrap-поддержке (1000 реплик). В качестве внешней группы использован *Halothiobacillus neapolitanus*. Звездочками отмечены виды *Beggiatoaceae*, для которых получены чистые культуры. Дерево отражает состав последовательностей, включенных в исходный анализ. Выделенные на дереве семейства *Leucotrichaceae*, *Thiofilaceae*, *Thiolineaceae* и *Thiotrichaceae* в классификации GTDB объединены в семейство *Thiotrichaceae* (релиз R11-RS232; [https://gtdb.ecogenomic.org/tree?r=f\\_\\_Thiotrichaceae](https://gtdb.ecogenomic.org/tree?r=f__Thiotrichaceae), дата обращения: 29.07.2026). В современной таксономии семейства дополнительно учитывается “*Candidatus Venteria*”, не представленный на данном дереве. Масштаб соответствует 0,05 замены на позицию (цит. по Gureeva *et al.*, 2019).

Анализ одного филогенетического маркера не обеспечивал надежного разграничения части близких родов и видов и не всегда позволял связать последовательность с конкретным морфотипом. Геномный материал отдельных микроманипулированных нитей впервые сделал такие организмы доступными для геномного анализа без получения чистой культуры (Mußmann *et al.*, 2007). Сопоставление морфологии индивидуально отобранных клеток и нитей с последовательностями 16S рРНК выявило несогласованность ряда традиционных названий с филогенией и позволило предложить несколько родов в статусе *Candidatus* (Salman *et al.*, 2011). В исследовании Salman *et al.* (2011) было получено более ста почти полноразмерных последовательностей гена 16S рРНК из вручную отобранных клеток и нитей. Для одного и того же объекта сопоставлялись размеры и организация клеток, вакуолизация, характер объединения нитей и положение на филогенетическом древе. Такой подход позволил отделить обозначения морфотипов от таксономических названий и связать предложенные рода с конкретными природными формами (Salman *et al.*, 2011).

Дальнейшее расширение выборки обеспечили амплифицированные геномы отдельных клеток (SAG; англ. single-amplified genome), полученные после полногеномной амплификации, и MAG. Геном *T. ingrica* был восстановлен из природного материала и сопоставлен с протеомными данными, хотя чистая культура этого организма отсутствовала (Kojima *et al.*, 2015). SAG представителей рода *Thiomargarita* и MAG из пресноводных хемосинтетических матов выявили дополнительные линии и значительную геномную вариабельность крупных серобактерий (Winkel *et al.*, 2016; Sharrar *et al.*, 2017).

Различие между геномной классификацией и формальной номенклатурой наиболее ясно проявляется при сопоставлении GTDB (англ. Genome Taxonomy Database) и LPSN. По данным LPSN, семейство *Beggiatoaceae* включает 21 родовую запись, в том числе названия *Candidatus*, исторические наименования и синонимы. Валидно опубликованные по Международному кодексу номенклатуры прокариот (ICNP; англ. International Code of Nomenclature of Prokaryotes) и принятые как правильные названия имеют четыре рода — *Beggiatoa*, *Thioploca*, *Thiomargarita* и *Thioflexithrix*. В их составе числится восемь видов с опубликованными названиями. Остальные представители семейства, включая большинство описанных морских

линий, представлены кандидатными или не имеющими номенклатурного статуса названиями (LPSN; <https://lpsn.dsmz.de/family/Beggiatoaceae>, дата обращения: 19.06.2026). GTDB решает другую задачу: распределяет доступные геномы изолятов, SAG и MAG по филогеномным кластерам, большинство которых обозначено служебными названиями (Parks *et al.*, 2026). В релизе R11-RS232 от 15 апреля 2026 года GTDB семейство представлено 78 геномными записями, образующими 27 родовых и 55 видовых кластеров ([https://gtdb.ecogenomic.org/tree?r=f\\_\\_Beggiatoaceae](https://gtdb.ecogenomic.org/tree?r=f__Beggiatoaceae), дата обращения: 19.06.2026). Эти показатели нельзя сопоставлять как два варианта числа родов или видов: LPSN отражает статус названий и номенклатурных типов, тогда как GTDB характеризует структуру доступного геномного разнообразия. Разрыв между ними показывает, насколько геномная выборка превышает формально оформленную часть семейства. Служебное родовое или видовое обозначение в GTDB фиксирует положение генома в данной версии классификации, но не создает номенклатурного названия. Напротив, присутствие имени в LPSN само по себе не означает, что за ним стоит доступная культура или репрезентативная геномная выборка.

Недостаток культур остается одним из главных ограничений полифазной систематики. Доступные чистые культуры и депонированные штаммы представлены только пресноводными видами — *B. alba*, *B. leptomitiformis* и *T. pseukupensis* (Strohl, Larkin, 1978; Dubinina *et al.*, 2017; Gureeva *et al.*, 2019). Морские представители семейства не выделены в чистые культуры и преимущественно описаны как кандидатные таксоны на основании исследования природных клеток и нитей, геномов отдельных клеток или MAG (Mußmann *et al.*, 2007; Salman *et al.*, 2011; MacGregor *et al.*, 2013a; Winkel *et al.*, 2016). Отсутствие чистой культуры затрудняет повторное исследование физиологии, сопоставление генома с фенотипом и создание доступного типового материала. “*Ca. Thiomargarita magnifica*” показывает, что детальное морфологическое и геномное описание само по себе не обеспечивает валидной публикации названия по ICNP (Volland *et al.*, 2022).

Организмы, известные преимущественно по геномным данным, находятся в статусе *Candidatus*, а SeqCode допускает использование геномной последовательности в качестве номенклатурного типа, создавая дополнительный по отношению к ICNP путь оформления названий (Hedlund *et al.*, 2022). “*Ca. Venteria ishoyei*” первоначально была предложена Fonseca *et al.* (2017) в составе семейства *Thiotrichaceae*. Позднее для

ее типификации по SeqCode была использована более полная геномная последовательность изолята G18 (Fonseca *et al.*, 2017; Fonseca *et al.*, 2025). В современной классификации этот род относят к семейству *Beggiatoaceae*.

Молекулярные и геномные методы показали, что морфологически сходные представители *Beggiatoaceae* могут принадлежать разным линиям, а резко различающиеся формы — иметь близкое происхождение. Однако стабилизация систематики требует совместного анализа высококачественных геномов, морфологии, физиологии, экологии и надежно связанных с ними типовых материалов. Геномные подходы не завершили классификацию семейства, а выявили масштаб разнообразия, которое еще предстоит согласовать с формальной номенклатурой.

#### 1.4 Метаболизм соединений серы

Использование восстановленных соединений серы является одной из наиболее характерных физиологических особенностей *Beggiatoaceae*. Наиболее подробно у представителей семейства исследовано окисление сульфида и тиосульфата. Эти субстраты превращаются разными ферментативными системами, однако у многих представителей оба процесса сопровождаются образованием промежуточной элементной серы, которая может накапливаться внутриклеточно и впоследствии подвергаться дальнейшему окислению. При этом образуется сульфит, который затем превращается в сульфат. Конкретный набор ферментативных систем, обеспечивающих эти стадии, различается между отдельными представителями семейства.

##### 1.4.1 Диссимиляционное окисление соединений серы

###### 1.4.1.1 Окисление сульфида

Начальную реакцию окисления сульфида у сероокисляющих бактерий осуществляют прежде всего сульфид:хиноноксидоредуктаза (SQR) и флавоцитохром-с-сульфиддегидрогеназа (FCSD). SQR передает электроны от сульфида на хиноны дыхательной цепи, тогда как FCSD включает флавопротеиновую и цитохром-с-содержащую субъединицы и обеспечивает перенос электронов с участием цитохромов с. Таким образом, две системы связывают окисление одного и того же субстрата с разными участками электрон-транспортной цепи. Для крупных серных бактерий предполагалось, что FCSD может иметь большее значение при низкой концентрации  $\text{H}_2\text{S}$ , тогда как SQR — при более высоком поступлении сульфида; эта гипотеза была

предложена при интерпретации геномных и экологических данных крупных *Beggiatoaceae* (Mußmann *et al.*, 2007).

Сравнительный анализ семи геномов представителей *Beggiatoaceae* показал присутствие генов *sqr*, кодирующих сульфид:хиноноксидоредуктазы, во всех исследованных геномах. Гены *fccA* и *fccB*, кодирующие соответственно цитохромную и флавопротеиновую субъединицы флавоцитохром-с-сульфиддегидрогеназы FccAB, были выявлены в шести из семи геномов (Winkel *et al.*, 2016). В геноме *T. ingrica* также выявлены *sqr* и *fccAB*. Протеомный анализ филаментов *T. ingrica*, собранных из природных донных осадков, также выявил белки, участвующие в окислении сульфида (Kojima *et al.*, 2015).

Физиологические исследования показывают, что окисление сульфида у *Beggiatoaceae* часто сопровождается накоплением элементной серы. У штамма *Beggiatoa* sp. ОН-75-В при использовании сульфида образовывались внутриклеточные включения элементной серы, которые после прекращения поступления сульфида могли расходоваться далее (Nelson, Castenholz, 1981).

У *B. alba* B18LD в аэробных условиях сульфид окислялся с образованием внутриклеточных включений элементной серы, которая накапливалась в клетках. При последующей аэробной инкубации нитей, предварительно выращенных в присутствии сульфида, меченного  $^{35}\text{S}$ , основная часть радиоактивной метки сохранялась во внутриклеточной сере. На основании микроскопических, респирометрических и изотопных данных авторы заключили, что в аэробных условиях внутриклеточная сера не окислялась до сульфата и не высвобождалась из клеток в культуральную среду в виде растворимых соединений серы (Schmidt *et al.*, 1987).

Для морских штаммов *Beggiatoa* показано полное окисление сульфида до сульфата при росте в градиентных культурах; степень промежуточного накопления серы различалась между штаммами и зависела от условий культивирования (Hagen, Nelson, 1997). Эти исследования также выявили различия в ферментативных системах окисления серных соединений у морских и пресноводных штаммов *Beggiatoa* (Hagen, Nelson, 1997).

У природных *Thioploca* сульфид также превращается через промежуточную элементную серу. В инкубационных экспериментах сульфат являлся конечным продуктом, причем скорость его образования существенно не увеличивалась при

добавлении сульфида, что согласуется с разделением процесса на образование элементной серы и ее последующее окисление (Otte *et al.*, 1999).

#### 1.4.1.2 Окисление тиосульфата

Использование тиосульфата показано у нескольких культивируемых *Beggiatoaceae*. У *Beggiatoa* sp. ОН-75-В при превращении тиосульфата образовывались приблизительно эквимольные количества сульфата и элементной серы; авторы интерпретировали этот процесс как вероятное диспропорционирование тиосульфата, причем часть накопленной серы впоследствии окислялась до сульфата (Nelson, Castenholz, 1981). *B. leptomitiformis* D-402 способен к хемолитоавтотрофному росту в присутствии тиосульфата в качестве донора электронов для энергетического метаболизма; его окисление сопровождается накоплением внутриклеточных серных глобул (Dubinina *et al.*, 2017). В отличие от D-402, близкородственный штамм D-401 не способен к хемолитоавтотрофному росту в присутствии тиосульфата и не накапливает внутриклеточную элементную серу (Fomenkov *et al.*, 2018). У *T. psekupsensis* D3<sup>T</sup> тиосульфат также служил донором электронов при хемолитоавтотрофном росте и окислялся с образованием эквимольных количеств элементной серы и сульфата; для штамма была измерена активность SoxB (Gureeva *et al.*, 2019).

Основной бактериальной системой окисления тиосульфата является Sox-комплекс, в состав которого входят белки SoxAX, SoxYZ и SoxB; в зависимости от варианта системы дополнительно могут присутствовать белки SoxCD. Выделяют полную, или неразветвленную, Sox-систему, включающую SoxAX, SoxYZ, SoxB и SoxCD, и разветвленную Sox-систему, в которой SoxCD отсутствует. Тиосульфат содержит два атома серы в разных степенях окисления — сульфонатный и сульфановый. В полной Sox-системе SoxCD обеспечивает окисление связанной с SoxYZ сульфановой серы, вследствие чего оба атома серы тиосульфата в конечном итоге превращаются в сульфат без накопления промежуточной элементной серы (Friedrich *et al.*, 2001; Grabarczyk, Berks, 2017).

В разветвленной Sox-системе SoxCD отсутствуют. После образования первого сульфата связанная с SoxYZ сульфановая сера не подвергается дальнейшему окислению внутри Sox-цикла. У серонакапливающих бактерий она далее переходит в промежуточную элементную серу, которая затем окисляется другими ферментативными системами. Наиболее подробно разветвленная Sox-система

исследована у *Allochromatium vinosum*: SoxAX, SoxYZ и SoxB необходимы для окисления тиосульфата, сопровождающегося обязательным образованием промежуточной элементной серы и последующим ее окислением до сульфата (Hensen *et al.*, 2006). Таким образом, при неразветвленной Sox-системе тиосульфат полностью окисляется до сульфата, тогда как при разветвленной системе образуются сульфат и промежуточная элементная сера, которая затем подвергается дальнейшему окислению (Hensen *et al.*, 2006; Grabarczyk, Berks, 2017).

Разветвленная Sox-система описана у ряда представителей *Beggiatoaceae*. У крупных вакуолизированных филаментов, исследованных Mußmann *et al.*, были выявлены гены *soxABXYZ*, тогда как *soxCD* отсутствовали (Mußmann *et al.*, 2007). В полном геноме *T. ingrica* гены *soxCD* также отсутствуют (Kojima *et al.*, 2015). Сходные наборы Sox-компонентов описаны у *Beggiatoa* sp. 35Flor, “*Candidatus Isobeggiatoa divolgata*”, “*Ca. Maribeggiatoa*” sp. и “*Candidatus Thiomargarita nelsonii*” Bud S10 (Winkel *et al.*, 2016). У *B. leptomitiformis* D-402 выявлены гены *soxAX*, *soxB*, *soxY* и *soxZ* при отсутствии *soxCD*. Такая организация соответствует разветвленному варианту Sox-системы и согласуется с накоплением внутриклеточных включений элементной серы при росте в присутствии тиосульфата (Dubinina *et al.*, 2017). Bailey *et al.* (2017) отмечали присутствие частичной Sox-системы, не включающей SoxCD, во всех доступных к тому времени геномах *Beggiatoaceae* и связывали ее с окислением тиосульфата и накоплением внутриклеточной элементной серы.

Помимо отсутствия SoxCD, для Sox-системы ряда представителей *Beggiatoaceae* характерно объединение SoxX- и SoxA-подобных областей в одном белке. У *B. leptomitiformis* D-402 ген *soxAX* кодирует один слитый белок SoxAX, N-концевая область которого соответствует SoxX, а С-концевая — SoxA. Слитый белок SoxAX также предсказан у *T. pseudosensu* D3, *Beggiatoa* sp. 35Flor, *B. alba* B18LD, “*Ca. Isobeggiatoa*” sp. и “*Ca. Maribeggiatoa*” sp. из Гуаймасского бассейна (Kreutzmann, 2013; Gureeva *et al.*, 2019; Gureeva, Grabovich, 2021). Слияние SoxX- и SoxA-подобных областей в одном полипептиде описано также у представителей рода *Halorhodospira*, включая *Halorhodospira halophila* (Imhoff *et al.*, 2022; Kreutzmann, 2013). Сходная доменная организация была предсказана для белка SoxAX из генома *Bradyrhizobium* sp. WSM2793 (Kreutzmann, 2013).

#### 1.4.1.3 Накопление и химический состав внутриклеточной серы

У ряда представителей *Beggiatoaceae* элементная сера временно накапливается в клетках в виде серных глобул, образующихся при окислении восстановленных соединений серы (Strohl *et al.*, 1982; Teske, Salman, 2014).

Первые спектроскопические исследования указывали на преобладание циклооктасеры  $S_8$  в серных включениях. Рамановская микроспектроскопия крупных морских филаментов из залива Монтерей, обозначенных авторами как *Thioploca* и *Beggiatoa*, показала присутствие серы преимущественно в форме циклооктасеры  $S_8$  (Pasteris *et al.*, 2001). При исследовании методом рентгеновской абсорбционной спектроскопии циклооктасера также была определена как преобладающая форма серы во включениях *B. alba* и *T. namibiensis* (Prange *et al.*, 2002).

Более позднее исследование показало, что состав серных включений у представителей рода *Beggiatoa* не ограничивается циклооктасерой. Рамановская микроспектроскопия внутриклеточных включений *Beggiatoa* sp. 35Flor и *B. alba* B18LD выявила сочетание  $S_8$  и неорганических полисульфидов  $S_n^{2-}$ , причем соотношение этих форм зависело от стадии роста и условий культивирования. У штамма *B. alba* B15LD те же формы серы были обнаружены преимущественно во внеклеточных частицах, тогда как внутри филаментов сера не выявлялась (Berg *et al.*, 2014). Это расходилось с более ранним ультраструктурным описанием серных включений B15LD внутри клеточной оболочки. Причина различий не была установлена; авторы допускали, что свойства поддерживаемой культуры могли измениться, возможно вследствие мутации (Strohl *et al.*, 1982; Berg *et al.*, 2014).

У *Beggiatoa* sp. 35Flor на раннем этапе накопления серы преобладала  $S_8$ , тогда как позднее возрастала доля полисульфидов. Полисульфиды обнаруживались и при последующем расходовании запасенной серы. Следовательно, серные включения у этого штамма были химически неоднородны и могли одновременно содержать циклооктасеру и неорганические полисульфиды (Berg *et al.*, 2014).

Количество серы, накопленной *Beggiatoa* sp. 35Flor, зависело от соотношения между поступлением сульфида и скоростью его дальнейшего окисления. При низком потоке сульфида большая доля поступившей серы окислялась до сульфата, тогда как увеличение потока сульфида сопровождалось более выраженным накоплением внутриклеточной элементной серы. Серные включения при этом постоянно

образовывались и расходовались (Berg *et al.*, 2014). Эти данные характеризуют запасенную серу как динамический промежуточный продукт, позволяющий разделять во времени начальное превращение сульфида и последующие стадии его полного окисления.

#### 1.4.1.4 Дальнейшее окисление запасенной серы

После образования внутриклеточной элементной серы начинается наиболее слабо изученная часть пути ее дальнейшего окисления — мобилизация запасенной серы и ее передача к ферментативным системам, образующим сульфит. У многих крупных *Beggiatoaceae* дальнейшее окисление серы связывают с системой обратной диссимиляционной сульфитредуктазы (rDSR). Центральный фермент DsrAB в окислительном направлении участвует в образовании сульфита, а система включает также серопереносящие белки DsrEFH и DsrC и мембранный комплекс DsrMKJOP.

Полный набор *dsrABEFHCMKLJOP* и дополнительные Dsr-компоненты обнаружены в геноме *T. ingrica*; многие белки пути окисления серы выявлены протеомно (Kojima *et al.*, 2015). Близкие к полным наборы генов rDSR-системы обнаружены также в геномах *Beggiatoa* sp. 35Flor, “*Ca. Isobeggiatoa divulgata*”, “*Ca. Maribeggiatoa*” sp. и отдельных “*Ca. Thiomargarita*” spp. (Winkel *et al.*, 2016). У *T. pseudosensilis* гены rDSR объединены в кластер *dsrABCEFHLMKJOPNR*; авторы связывают эту систему с дальнейшим окислением промежуточной элементной серы до сульфита (Gureeva *et al.*, 2019).

Сам этап передачи серы от внутриклеточных включений серы к rDSR у *Beggiatoaceae* не показан. Перенос серы между компонентами этой системы наиболее подробно исследован у *Allochromatium vinosum*, где экспериментально установлена передача сульфановой серы от персульфидированного DsrEFH на DsrC (Stockdreher *et al.*, 2012). DsrMKJOP участвует в электронном обмене, связанном с дальнейшим окислением серы; мутационный анализ *Allochromatium vinosum* показал необходимость компонентов комплекса для нормального расходования внутриклеточной серы (Sander *et al.*, 2006). Для представителей *Beggiatoaceae* этап, связывающий запасенную серу с DsrEFH/DsrC, пока не охарактеризован.

У отдельных представителей *Beggiatoaceae* обнаружены гены, кодирующие белки, гомологичные субъединицам гетеродисульфидредуктазы (Hdr). Однако наличие у них полного сероокисляющего комплекса, подобного гетеродисульфидредуктазе

sHdr, и его участие в окислении запасенной элементной серы не установлены (Kojima *et al.*, 2015; Fonseca *et al.*, 2017; Tanabe *et al.*, 2024). У *T. ingrica* гены *hdrAACB* рассматриваются как компоненты хинон-взаимодействующего мембранного оксидоредуктазного комплекса Qmo, функционально связанного с APS-редуктазой AprAB при непрямом аденозин-5'-фосфосульфатном (APS-зависимом) окислении сульфита (Kojima *et al.*, 2015). В геноме “*Ca. Venteria ishoyei*” обнаружены *hdrAB*, тогда как *hdrC* или его гомолог выявлен не был (Fonseca *et al.*, 2017).

У некоторых представителей семейства не подтверждено наличие полного пути окисления запасенной серы. У *B. leptomitiformis* D-402 не выявлены ни полный набор белков rDSR, ни сероокисляющий комплекс HdrCBAHypHdrCB. Поэтому ферментативный механизм превращения накопленной элементной серы в сульфит у этого штамма остается неустановленным (Watanabe *et al.*, 2019). В частности, у *B. alba* B18LD обнаружены лишь отдельные компоненты rDSR, причем физиологически этот штамм не способен окислять накопленную элементную серу до сульфата (Berg *et al.*, 2014; Winkel *et al.*, 2016). Однако отсутствие у него альтернативной Hdr-зависимой системы непосредственно не установлено. Для “*Ca. Thiomargarita nelsonii*” Bud S10 и Thio36 полнота rDSR оценена неоднозначно из-за фрагментированности геномных сборок, поэтому утверждать отсутствие системы нельзя (Winkel *et al.*, 2016).

#### 1.4.1.5 Окисление сульфита до сульфата

При дальнейшем окислении промежуточной серы сульфит может образовываться как промежуточный продукт и затем превращаться в сульфат. Исследования морских и пресноводного штаммов *Beggiatoa* выявили различия в активности ферментов прямого и непрямого путей окисления сульфита. Это показывает, что даже у штаммов, отнесенных к одному роду, конечная стадия окисления серы может обеспечиваться различными ферментативными системами (Hagen, Nelson, 1997).

Сульфит может окисляться до сульфата непосредственно или через не прямой APS-зависимый путь. Один из вариантов прямого окисления связан с мембранной сульфит:хиноноксидоредуктазой SoeABC, тогда как APS-зависимое окисление осуществляется APS-редуктазой AprAB и АТФ-сульфурилазой Sat. Функция SoeABC

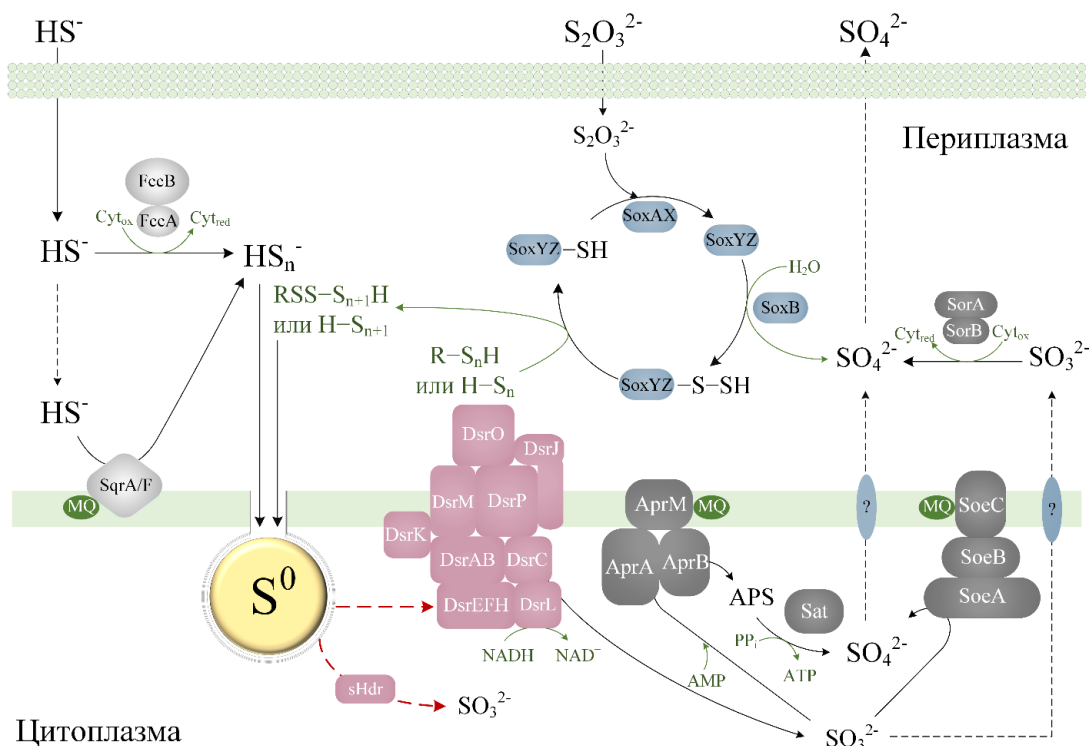
как основного фермента прямого окисления сульфита экспериментально установлена у *Allochromatium vinosum* с использованием мутантов (Dahl *et al.*, 2013).

Для *B. leptomitiformis* D-402 обнаружены гены *soeABC*, кодирующие субъединицы мембранной сульфит:хиноноксидоредуктазы SoeABC (Watanabe *et al.*, 2019). Сравнительный анализ геномов “*Ca. Thiomargarita nelsonii*” Thio36 и Bud S10, “*Ca. Isobeggiatoa divolgata*” и “*Ca. Maribeggiatoa*” sp. выявил гены *aprAB* и *sat*, кодирующие APS-редуктазу AprAB и АТФ-сульфурилазу Sat, APS-зависимого пути окисления сульфита (Winkel *et al.*, 2016). В геноме “*Ca. Thiomargarita nelsonii*” Bud S10 дополнительно обнаружен ген *sorA*, аннотированный как ген сульфитдегидрогеназы (Flood *et al.*, 2016). Наличие этих генов указывает на метаболический потенциал соответствующих реакций, но не подтверждает активности кодируемых ими ферментов.

В геноме *T. ingrica* обнаружены гены двух систем окисления сульфита: гены *aprAB* и *sat*, обеспечивающие непрямой APS-зависимый путь окисления сульфита, а также *sorAB*, кодирующие периплазматическую сульфитдегидрогеназу SorAB, осуществляющую прямое окисление сульфита. Белки SorAB были выявлены при протеомном анализе, однако их ферментативную активность у *T. ingrica* экспериментально не исследовали (Kojima *et al.*, 2015).

У вида *T. psekupsensis* предполагается участие rDSR в окислении промежуточной элементной серы с образованием сульфита, тогда как механизм последующего окисления сульфита до сульфата остается неясным (Gureeva *et al.*, 2019; Gureeva, Grabovich, 2021).

Таким образом, окисление восстановленных соединений серы у *Beggiatoaceae* состоит из ряда этапов: окисления сульфида до элементной серы с участием SQR и FCSD, окисления тиосульфата до сульфата и промежуточной элементной серы с участием разветвленной Sox-системы, последующего окисления элементной серы системой rDSR до сульфита и превращения сульфита в сульфат (Рисунок 3). Однако отдельные стадии этого процесса охарактеризованы неравномерно. Наибольшая неопределенность связана с мобилизацией и дальнейшим окислением накопленной элементной серы, поскольку у некоторых представителей отсутствуют или представлены неполно известные rDSR- и Hdr-зависимые системы.



**Рисунок 3 — Обобщенная схема диссимиляционного метаболизма соединений серы у представителей *Beggiatoaceae***

FccAB, флавоцитохром-с-сульфиддегидрогеназа; SqrA/F, сульфид:хинооксидоредуктаза; SoxAXBYZ, компоненты разветвленной Sox-системы окисления тиосульфата; MQ, менахинон; rDSR, система обратной диссимиляционной сульфитредуктазы; DsrEFH и DsrC, компоненты транспорта серных соединений rDSR-системы; DsrL, цитоплазматический железо-серный флавопротеин, редокс-партнер rDsrAB; AprAB, APS-редуктаза; AprM, мембраносвязанный компонент APS-зависимого пути; Sat, АТФ-сульфурилаза; APS, аденозин-5'-фосфосульфат; SoeABC, мембранная сульфит:хинооксидоредуктаза; SorAB, сульфитдегидрогеназа; sHdr, предполагаемый Hdr-подобный сероокисляющий комплекс;  $\text{HS}^-$ , гидросульфид-ион;  $\text{HS}_n^-$ , гидрополисульфид-анионы, содержащие цепочку из  $n$  атомов серы ( $n \geq 2$ );  $\text{S}^0$ , внутриклеточная элементарная сера;  $\text{RSS-S}_{n+1}\text{H}$ , тиольное соединение, содержащее сульфановую серу;  $\text{H-S}_{n+1}$ , полисульфид;  $\text{R-S}_n\text{H}$ , органическое соединение, содержащее сульфановую серу. Черными стрелками обозначены основные направления превращения соединений серы, черными пунктирными — перенос соединений через мембрану, зелеными — сопряженные реакции переноса электронов и превращения кофакторов, красными пунктирными — предполагаемые или экспериментально не подтвержденные этапы, включая мобилизацию запасенной  $\text{S}^0$  и возможное участие sHdr (адаптировано по Weissgerber *et al.*, 2014b; Ravin *et al.*, 2022).

#### 1.4.2 Восстановление элементарной серы и тиосульфата

У *B. alba* B18LD при кратковременной инкубации в анаэробных условиях наблюдалось накопление  $\text{H}_2\text{S}$ , на основании чего было высказано предположение о возможном восстановлении внутриклеточной элементарной серы и ее использовании в качестве терминального акцептора электронов. Процесс сопровождался окислением эндогенных запасов углерода и усиливался в присутствии  $\text{H}_2$ . У штамма была выявлена гидрогеназная активность, причем потребление  $\text{H}_2$  наблюдалось у филаментов,

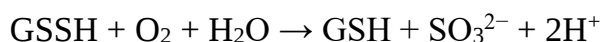
содержащих внутриклеточные включения серы, что также указывало на возможное сопряжение окисления  $H_2$  с восстановлением серы. Однако непосредственный механизм восстановления элементной серы и участвующие в нем ферменты установлены не были (Schmidt *et al.*, 1987).

Наиболее убедительно серное дыхание показано у *Beggiatoa* sp. 35Flor. При длительном выращивании в условиях высокого потока сульфида часть филаментов перемещалась из зоны окисления сульфида в область с анаэробными условиями градиентной культуры. Там одновременно уменьшались запасы внутриклеточной элементной серы и полигидроксиалканоатов, внутриклеточных запасных соединений углерода, а в среде образовывался  $H_2S$ . Поскольку кислород и окисленные соединения азота в этой зоне отсутствовали, запасенная элементная сера служила терминальным акцептором электронов, а полигидроксиалканоаты — их донором (Schwedt *et al.*, 2012). После расходования части запасенной серы филаменты могли возвращаться к границе с кислородом и снова накапливать серные включения при окислении сульфида.

Для *B. leptomitiformis* D-402 в сравнительной фенотипической характеристике отмечена способность восстанавливать элементную серу или тиосульфат с образованием  $H_2S$  (Dubinina *et al.*, 2017). Однако для этого штамма не приведены данные, сопоставимые со стехиометрическим и физиологическим обоснованием серного дыхания у 35Flor.

#### 1.4.3 Персульфиддиоксигеназа и возможная роль в метаболизме серы у *Beggiatoaceae*

Персульфиддиоксигеназы (PDO) — это моноядерные негемовые  $Fe^{2+}$ -зависимые ферменты, катализирующие кислородзависимое окисление сульфанового атома серы низкомолекулярных персульфидов до сульфита. Исторически их обозначали как диоксигеназы серы SDO, поскольку активность определяли по окислению элементной серы в присутствии восстановленного глутатиона (GSH). Позднее было установлено, что непосредственным субстратом является не циклическая  $S_8$ , а персульфид, образующийся при взаимодействии GSH с сульфановой серой. Наиболее изученным субстратом является глутатионперсульфид (GSSH). Катализируемая PDO реакция имеет следующий вид (Rohwerder, Sand, 2003):



Кислород выступает как косубстрат, включающийся в сульфит, а не как терминальный акцептор электронов. Для SdoA *Cupriavidus necator* показано эквимольное потребление GSSH и O<sub>2</sub> с образованием GSH и сульфита (Liu *et al.*, 2014). Кроме GSSH, некоторые PDO используют другие персульфиды; CstB *Staphylococcus aureus* эффективно окисляет персульфид коэнзима А (CoASSH) и персульфид бациллатиола (BSSH) (Shen *et al.*, 2015).

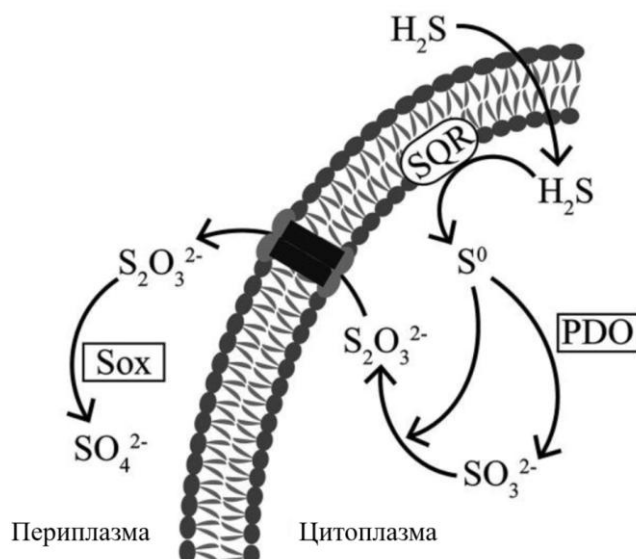
Активный центр PDO содержит один ион Fe<sup>2+</sup>, координированный двумя остатками гистидина и одним карбоксилатным лигандом. Структурные и спектроскопические данные показывают, что персульфидная сера непосредственно взаимодействует с Fe<sup>2+</sup>, а связывание субстрата создает координационную позицию для O<sub>2</sub> (Sattler *et al.*, 2015; Goudarzi *et al.*, 2018). Помимо каталитического Fe<sup>2+</sup>, дополнительные редокс-кофакторы для классических PDO не требуются (Shen *et al.*, 2015; Pettinati *et al.*, 2015; Goudarzi *et al.*, 2018).

PDO относятся к суперсемейству металло-β-лактамаз, представители которого характеризуются сходной пространственной структурой, несмотря на различия в каталитических функциях. Поэтому принадлежность белка к этому суперсемейству сама по себе недостаточна для его идентификации как PDO. Для PDO характерны особенности строения металл-связывающего центра и консервативные аминокислотные остатки, отличающие их от близкородственных белков; окончательное подтверждение функции дает определение персульфиддиоксигеназной активности (Liu *et al.*, 2014; Sattler *et al.*, 2015).

На основании филогенетического анализа PDO подразделяют на три типа. Тип I объединяет ETHE1-подобные ферменты, включая hETHE1 человека, ETHE1 *Arabidopsis thaliana* и MxETHE1a *Mycobacterium xanthus*. К типу II относятся SdoA/PdoA- и Blh-подобные белки, в частности SdoA *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas aeruginosa*, а также Blh *Agrobacterium tumefaciens*. Тип III включает филогенетически обособленные PDO бактерий и архей; его представителями являются CstB *Staphylococcus aureus* и PDOIII *Bacillus cereus* и *Zunongwangia profunda* (Liu *et al.*, 2014; Sattler *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2017). SdoS-подобные ферменты, включая SdoI *Acidithiobacillus caldus*, образуют одну из подгрупп типа III, поэтому обозначение SdoS не является синонимом всего типа III (Wu *et al.*, 2017). Несмотря на различия, общий Fe<sup>2+</sup>-зависимый механизм катализа сохраняется.

Физиологические функции PDO можно разделить на два направления. Во-первых, у гетеротрофных бактерий PDO участвуют в детоксикации  $H_2S$  и регуляции содержания сульфановой серы. У *Staphylococcus aureus* делеция *cstB* приводила к увеличению задержки роста в присутствии гидросульфида натрия. Комплементация мутантного штамма  $\Delta cstB$  геном *cstB* дикого типа сокращала задержку роста до уровня, близкого к дикому типу, тогда как экспрессия вариантов CstB с заменами Cys201Ser и Cys408Ser такого эффекта не обеспечивала. Это указывает на значение ферментативной активности CstB для устойчивости клеток к  $H_2S$  (Shen *et al.*, 2015). У *Pseudomonas aeruginosa* инактивация PDO приводит к накоплению  $H_2S$ , а рекомбинантный фермент окисляет GSSH (Giordano *et al.*, 2026).

Во-вторых, у некоторых сероокисляющих бактерий PDO включена в путь окисления восстановленных соединений серы. У *Cupriavidus pinatubonensis* сульфид окисляется SQR до сульфановой/полисульфидной серы, которая через низкомолекулярные персульфиды поступает к PDO. Образующийся сульфит может превращаться в тиосульфат, который далее окисляется до сульфата полной Sox-системой, включающей SoxCD (Xin *et al.*, 2020) (Рисунок 4). Эксперименты с мутантами *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 показали, что PDO может участвовать в утилизации сульфановой серы, образующейся при работе разветвленной Sox-системы, без белков SoxCD. При делеции *soxCD* окисление тиосульфата сопровождалось временным накоплением сульфановой серы, содержание которой достигало около 80 мкМ, после чего она практически полностью исчезала. При этом весь использованный тиосульфат в конечном итоге окислялся до сульфата. В исходном штамме, содержащем SoxCD, делеция обеих PDO практически не влияла на окисление тиосульфата, тогда как при отсутствии SoxCD PDO обеспечивала альтернативный путь утилизации образующейся сульфановой серы. Одновременное удаление SoxCD и обеих PDO приводило к неполному окислению тиосульфата до сульфата и выделению части серы в виде  $H_2S$  (Xin *et al.*, 2023). SQR и PDO выполняют разные функции: SQR окисляет сульфид с передачей электронов в хиноновый пул, тогда как PDO катализирует кислородзависимое окисление персульфида до сульфита и непосредственно не участвует в переносе электронов в дыхательную цепь.



**Рисунок 4 — Схема окисления сульфида с участием персульфиддиоксигеназы у *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134**

SQR, сульфид:хинооксидоредуктаза; PDO, персульфиддиоксигеназа. Обозначение  $S^0$  соответствует сульфановой сере и не подразумевает непосредственного окисления элементарной серы PDO (цит. по Xin *et al.*, 2020).

Ключевой момент для *Beggiatoaceae*: PDO не окисляет элементарную серу ( $S^0$  или  $S_8$ ) напрямую. Если PDO участвует в расходовании внутриклеточной серы, необходим промежуточный этап ее мобилизации и образования низкомолекулярного персульфида. Химически превращение  $S^0$  в персульфид возможно, например, через полисульфиды. В клетках *Beggiatoa* обнаружены неорганические полисульфиды  $S_n^{2-}$  наряду с  $S_8$ , причем их содержание возрастает в периоды накопления и расходования серы (Berg *et al.*, 2014). Полисульфиды могут реагировать с низкомолекулярными тиолами с образованием соответствующих персульфидов, однако такой физиологический путь у *Beggiatoaceae* не продемонстрирован.

Интерес к возможной роли PDO у *Beggiatoaceae* связан с тем, что у отдельных представителей, включая *B. leptomitiformis* D-402 и *B. alba* B18LD, известные ферментативные системы не позволяют полностью объяснить дальнейшее превращение запасенной элементарной серы (Schmidt *et al.*, 1987; Dubinina *et al.*, 2017; Winkel *et al.*, 2016; Watanabe *et al.*, 2019). Поскольку PDO не окисляет  $S^0$  непосредственно, ее участие в этом процессе возможно только после предварительной мобилизации серы и образования низкомолекулярного персульфида, окисляемого до сульфита. Таким образом, PDO можно рассматривать как предполагаемый компонент альтернативного пути дальнейшего окисления запасенной серы, однако образование ее

субстрата и участие самого фермента в этом процессе требуют экспериментального подтверждения.

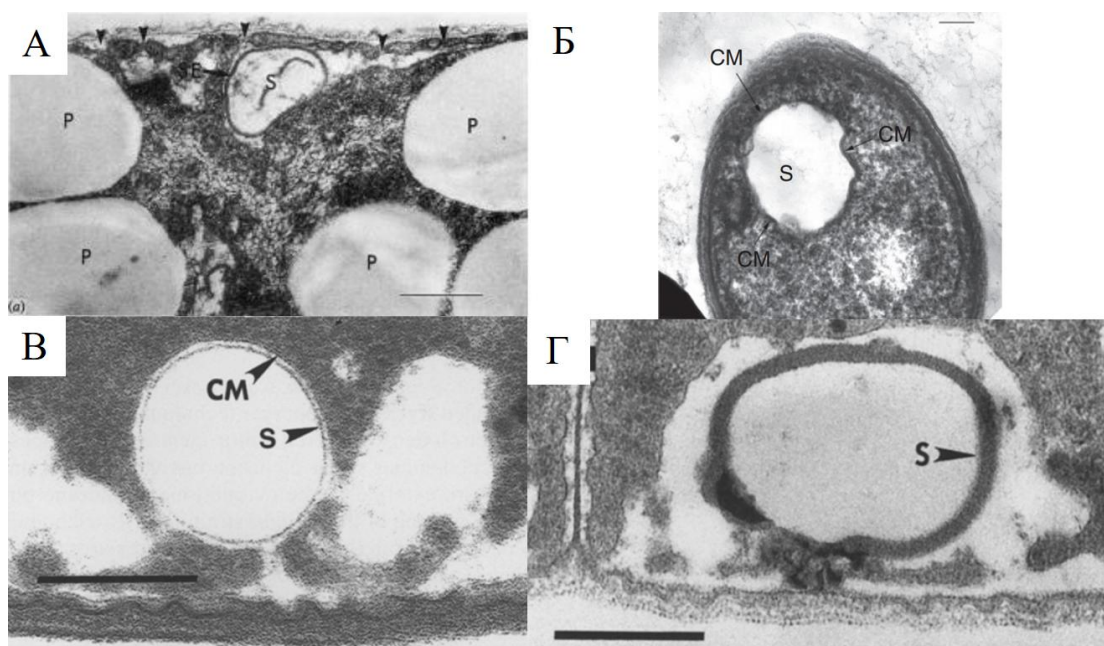
#### 1.4.4 Белки оболочки серных глобул Sgp

Серные глобулы представляют собой внутриклеточные включения элементной серы, образующиеся у многих сероокисляющих бактерий как промежуточное депо при окислении восстановленных соединений серы. У разных организмов они могут иметь внутриклеточное или внеклеточное расположение. У ряда организмов серные включения окружены оболочкой, состоящей преимущественно из белков. В ранних работах ее называли «белковой мембраной», однако эта структура не является мембраной в общепринятом биологическом смысле, поскольку не имеет липидного бислоя (Schmidt *et al.*, 1971; Nicolson, Schmidt, 1971; Dahl, Prange, 2006; Maki, 2013). Наиболее детально состав и функции белков серных глобул Sgp охарактеризованы у пурпурной серной бактерии *Allochromatium vinosum*.

У *Allochromatium vinosum* очищенные серные частицы содержали около 93 % серы, 5 % белка и 0,6 % липидов (Schmidt *et al.*, 1971). Изолированные оболочки после удаления серы образовывали мономолекулярный слой глобулярных субъединиц диаметром около 2,5 нм, что подтверждает белковую природу оболочки (Nicolson, Schmidt, 1971). Впоследствии из глобул были выделены три основных белка с молекулярными массами около 10,5, 10,65 и 8,5 кДа. Первоначально их обозначили как CV1, CV2 и CV3 — по прежнему названию вида *Chromatium vinosum*; после идентификации соответствующих генов за ними закрепились названия SgpA, SgpB и SgpC. Белки SgpA и SgpB гомологичны друг другу, тогда как SgpC отличается от них по последовательности (Brune, 1995; Pattaragulwanit *et al.*, 1998). Гены *sgpA*, *sgpB* и *sgpC* не образуют единого оперона; их первичные продукты содержат N-концевые сигнальные пептиды, что обеспечивает экспорт белков в периплазму, где локализованы серные глобулы (Pattaragulwanit *et al.*, 1998).

Несмотря на внутриклеточное расположение, серные глобулы имеют экстрацитоплазматическую топологию и не локализованы непосредственно в цитоплазме. У *Allochromatium vinosum* глобулы находятся в периплазме, что было показано на основании N-концевых сигнальных пептидов SgpA–C и подтверждено исследованиями локализации белков оболочки (Pattaragulwanit *et al.*, 1998; Prange *et al.*, 2004; Kümpel *et al.*, 2023). Сходная экстрацитоплазматическая локализация серных

глобул характерна по меньшей мере для части представителей *Beggiatoaceae*. У *B. alba* серные включения четырех исследованных штаммов располагались снаружи от цитоплазматической мембраны, но внутри комплекса клеточной стенки (Strohl *et al.*, 1981b) (Рисунок 5А, В). У штамма B15LD они находились в компартментах, окруженных инвагинатами цитоплазматической мембраны, и, следовательно, были отделены от цитоплазмы (Strohl *et al.*, 1982) (Рисунок 5А). У *T. pseudotuberculosis* глобулы элементарной серы также наблюдались в периплазматическом пространстве в инвагинатах цитоплазматической мембраны (Gureeva, Grabovich, 2021) (Рисунок 5Б).



**Рисунок 5 — Ультраструктура серных включений у *B. alba* и *T. pseudotuberculosis***

**А** — Серные включения у штамма B15LD, окруженные оболочкой. Стрелками отмечены участки формирования инвагинатов цитоплазматической мембраны. **Б** — Ультратонкий срез клетки штамма *T. pseudotuberculosis* D3 с серной глобулой и цитоплазматической мембраной. Масштаб 200 нм. **В** — Серные включения у штамма B25RD, локализованные внутри инвагината цитоплазматической мембраны. **Г** — Серная глобула у штамма B15LD; отдельные слои ее оболочки не дифференцируются. Масштаб А, В и Г 250 нм. S — серные включения (серная глобула); SE — оболочка серной глобулы; CM — цитоплазматическая мембрана (цит. по Strohl *et al.*, 1982; Gureeva, Grabovich, 2021; Strohl *et al.*, 1981b).

Функциональная роль SgpA–C исследована с помощью направленного мутагенеза. Одиночная инактивация *sgpA* или *sgpB* не приводила к заметным изменениям глобул, что свидетельствует о способности SgpA и SgpB взаимно компенсировать отсутствие друг друга; мутант по *sgpC* образовывал меньшие глобулы. Однако двойной мутант *sgpBC* полностью утрачивал способность формировать нормальные серные глобулы и не рос при использовании сульфида как донора

электронов (Prange *et al.*, 2004). Таким образом, Sgp-белки функционируют как комплекс, необходимый для нормального формирования серных глобул, тогда как отдельный белок не способен самостоятельно обеспечить образование полноценной оболочки.

Помимо SgpA–C, у *Allochrodatum vinosum* выявлен еще один ассоциированный с серными глобулами белок — SgpD (Alvin\_2515). Он был обнаружен при масс-спектрометрическом анализе белков фракции, обогащенной серными глобулами. SgpD имеет предполагаемый сигнальный пептид и локализуется в глобулах, что подтверждено слиянием с флуоресцентным белком; однако делеция *sgpD* не влияла на формирование или размер глобул, рост на сульфиде или превращение серы (Weissgerber *et al.*, 2014a; Kümpel *et al.*, 2023). SgpD, по-видимому, не является обязательным компонентом оболочки, и его физиологическая роль остается неясной.

Механизм, посредством которого потеря оболочки прекращает рост на сульфиде, остается неизвестным; прямое участие Sgp в ферментативном окислении серы не показано (Prange *et al.*, 2004). Отсутствие оболочки может приводить к нарушению безопасного хранения  $S^0$ . Без организованного компартмента сера может накапливаться в неправильной форме или локализации, что, в свою очередь, способно изменять доступность субстрата для последующих этапов метаболизма или вызывать токсические эффекты промежуточных форм серы, таких как полисульфиды. Однако эти предположения остаются гипотезами и не подтверждены прямыми экспериментами (Weissgerber *et al.*, 2013).

У *Beggiatoaceae* данные о белковом составе оболочки серных глобул ограничены. У *B. alba* B18LD энергодисперсионный рентгеновский микроанализ подтвердил, что включения представлены серой (Lawry *et al.*, 1981). Ультраструктурные исследования четырех штаммов *B. alba* показали, что серные глобулы окружены одиночным электронно-плотным слоем толщиной 4–5 нм у трех штаммов, тогда как у B15LD оболочка была пенталаминарной и достигала 12–14 нм (Strohl *et al.*, 1981b) (Рисунок 5Г). Электрофорез обогащенных препаратов серных включений B18LD выявил два белковых компонента с молекулярными массами около 13 и 15 кДа, однако их последовательности не установлены, и отождествление с SgpA–C невозможно (Schmidt *et al.*, 1986).

Белковые Sgp-оболочки не являются универсальной особенностью серных глобул. Например, у *Chlorobaculum tepidum* серные глобулы образуются внеклеточно, а классические SgpA–C отсутствуют (Chan *et al.*, 2008; Holkenbrink *et al.*, 2011). Таким образом, отсутствие классических SgpA–C у бактерий с внеклеточными серными глобулами показывает, что эти белки не являются универсальным компонентом всех серных включений. Однако у *Allochromatium vinosum* Sgp необходимы для нормальной организации внутриклеточно локализованных серных глобул, тогда как степень универсальности этого механизма для других бактерий остается неизвестной.

## 1.5 Углерод, азот и другие направления метаболизма

### 1.5.1 Метаболизм углерода

У представителей *Beggiatoaceae* обнаружено значительное разнообразие трофических стратегий — от гетеротрофии и миксотрофии до факультативной и облигатной хемолитоавтотрофии. У *B. alba* B18LD в непрерывной культуре был показан гетеротрофный рост на ацетате и миксотрофный рост при сочетании ацетата с сульфидом или тиосульфатом. При миксотрофном росте выход биомассы на использованный ацетат был примерно втрое выше, чем при гетеротрофном росте. Авторы связывали это с использованием сульфида для получения энергии, тогда как ацетат в значительной степени направлялся на биосинтез. При гетеротрофном росте возрастало накопление полигидроксibuтирата (PHB) и углеводов (Güde *et al.*, 1981). У морских штаммов *Beggiatoa* sp. MS-81-1c и MS-81-6 трофические различия были еще более выражены: первый являлся облигатным хемолитоавтотрофом и мог включать ацетат в клеточный материал, но не окислял его как энергетический субстрат, тогда как штамм MS-81-6 проявлял факультативную хемолитоавтотрофию (Hagen, Nelson, 1996). Таким образом, включение органического углерода в биомассу у *Beggiatoaceae* не всегда означает его использование как источника энергии.

Основным физиологически подтвержденным путем автотрофной фиксации CO<sub>2</sub> у исследованных *Beggiatoaceae* является цикл Кальвина–Бенсона–Бэссема. Для *B. leptomitiformis* D-402 показан хемолитоавтотрофный рост в микроаэробных условиях, сопровождавшийся высокой активностью рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (Рубиско) и фосфорибулокиназы и интенсивной фиксацией CO<sub>2</sub> (Patriitskaya *et al.*, 2001). У природных *Thioploca* одновременно измеряли фиксацию CO<sub>2</sub> и включение ацетата без его заметного окисления до CO<sub>2</sub>, что

указывает на возможность миксотрофного роста (Otte *et al.*, 1999). У *B. alba* B18LD типичные механизмы автотрофной фиксации CO<sub>2</sub> выявлены не были. Ассимиляция CO<sub>2</sub> зависела от присутствия ацетата и, вероятно, осуществлялась через карбоксилирующие реакции центрального метаболизма, включая реакции NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназы и малик-фермента (Strohl *et al.*, 1981a). Поэтому геномный потенциал фиксации CO<sub>2</sub> и реально реализуемый способ питания необходимо рассматривать отдельно.

Сравнительные исследования показывают, что у различных крупных *Beggiatoaceae* цикл Кальвина–Бенсона–Бэссема может быть представлен разными формами Рубиско, однако сами по себе такие различия не позволяют судить о фактическом трофическом режиме. У представителей *Beggiatoaceae* выявлены Рубиско форм IAq, IC и II (Gureeva *et al.*, 2019; Winkel *et al.*, 2016; Ravin *et al.*, 2024). Форма IAq характерна для *T. pseukupensis*, *T. ingrlica*, “*Ca. Isobeggiatoa divolgata*”, ряда морских *Beggiatoa*-подобных линий и части представителей “*Ca. Parabeggiatoa*” (Gureeva *et al.*, 2019; Ravin *et al.*, 2024). Форма IC обнаружена у пресноводных *B. leptomitiformis* и *B. alba* (Dubinina *et al.*, 2017; Gureeva *et al.*, 2019). Форма II распространена у “*Ca. Maribeggiatoa*”, отдельных линий “*Ca. Thiomargarita*”, *Beggiatoa* sp. 35Flor и “*Ca. Venteria ishoyei*” (MacGregor *et al.*, 2013a; Winkel *et al.*, 2016; Fonseca *et al.*, 2017). Различия в типах Рубиско обнаруживаются даже между близкородственными штаммами и могут отражать адаптацию к различным соотношениям CO<sub>2</sub> и O<sub>2</sub>; филогенетическая неконгруэнтность отдельных генов Рубиско также указывает на возможность их горизонтального переноса (MacGregor *et al.*, 2013a; Winkel *et al.*, 2016).

Дополнительным направлением углеродного обмена у представителей семейства является факультативная метилотрофия, показанная для *B. alba* B18LD и OH75-2a, а также *B. leptomitiformis* D-402, способных использовать метанол (Jewell *et al.*, 2008; Orlova *et al.*, 2018). Для D-402 показано его окисление до CO<sub>2</sub> с последующей ассимиляцией образованного CO<sub>2</sub> через цикл Кальвина–Бенсона–Бэссема, тогда как способность к использованию метана не обнаружена (Orlova *et al.*, 2018).

### 1.5.2 Метаболизм соединений азота

Соединения азота у *Beggiatoaceae* выполняют как биосинтетическую, так и энергетическую функцию. Ассимиляционный метаболизм включает восстановление нитрата до аммония с последующим включением азота в клеточные компоненты, тогда как при диссимиляционном восстановлении нитрат используется как акцептор электронов и может восстанавливаться, в зависимости от представителя, до аммония (DNRA; англ. dissimilatory nitrate reduction to ammonium) или газообразных соединений азота в ходе денитрификации. Для *B. alba* B18LD основным путем ассимиляции аммония является система глутаминсинтетаза–глутаматсинтаза (Vargas, Strohl, 1985a). Этот штамм способен использовать нитрат и нитрит как источники азота; при восстановлении нитрата образовывался аммоний, тогда как  $N_2$  и  $N_2O$  не выявлялись. При этом нитрат не обеспечивал анаэробный рост как единственный акцептор электронов, а нитратредуктаза была интерпретирована преимущественно как компонент ассимиляционного восстановления нитрата (Vargas, Strohl, 1985b). Поэтому образование  $NH_4^+$  у B18LD не следует отождествлять с диссимиляционным восстановлением нитрата до аммония (Vargas, Strohl, 1985a; Winkel *et al.*, 2016).

Диссимиляционное использование нитрата показано у крупных вакуолизированных *Beggiatoaceae*, способных накапливать его внутриклеточно и использовать в качестве акцептора электронов при окислении восстановленных соединений серы. У морских *Thioploca* внутриклеточная концентрация нитрата достигала примерно 500 мМ; движущиеся трихомы переносили этот запас из поверхностных слоев осадка на глубину 5–10 см и восстанавливали нитрат одновременно с окислением сульфида (Fossing *et al.*, 1995). В последующих опытах с  $^{15}NO_3^-$  основным продуктом восстановления нитрата у природных *Thioploca* был аммоний, что указывает на DNRA; образование  $N_2$  было значительно слабее и не могло быть однозначно отделено от активности эписимбионтов (Otte *et al.*, 1999). Накопление высоких концентраций нитрата и высокая активность мембранной нитратредуктазы показаны также у широких вакуолизированных морских представителей *Beggiatoaceae* (McHatton *et al.*, 1996).

Крупные клетки *T. namibiensis* также способны накапливать нитрат в центральной вакуоли в концентрации до примерно 800 мМ (Schulz *et al.*, 1999). Накопленный нитрат может использоваться как акцептор электронов при окислении

восстановленных соединений серы в анаэробных условиях, что свидетельствует о его диссимиляционной функции (Schulz, de Beer, 2002). Вместе с тем конечный путь восстановления нитрата у *T. namibiensis* окончательно не установлен: имеющиеся данные допускают как восстановление до аммония, так и образование  $N_2$  (Winkel *et al.*, 2016).

Функциональная роль нитратной вакуоли особенно подробно исследована у “*Candidatus Allobeggiatoa halophila*”. В ее мембране выявлены компоненты электрон-транспортной цепи и АТФаза V-типа ( $V_1V_0$ -АТФаза); эксперименты с ингибиторами показали, что восстановление нитрата участвует в формировании протон-движущей силы, используемой для сохранения энергии (Beutler *et al.*, 2012). При этом конечная судьба нитрата у *Beggiatoaceae* неодинакова. У крупных нитчатых форм из бассейна Гуаймас белые филаменты одновременно осуществляли денитрификацию и DNRA, причем образование  $N_2$  преобладало над образованием  $NH_4^+$ , тогда как у оранжевых филаментов собственная активность была связана преимущественно с DNRA (Schutte *et al.*, 2018). Таким образом, даже у близких крупных *Beggiatoaceae* распределение нитрата между восстановлением до  $N_2$  и  $NH_4^+$  может различаться.

Другим способом компенсации недостатка связанного азота служит фиксация  $N_2$ . Нитрогеназная активность, определяемая по восстановлению ацетилен, была показана у ряда морских и пресноводных *Beggiatoa* при росте в микроаэробных условиях в отсутствие добавленного связанного азота (Nelson *et al.*, 1982). Для B18LD ее индукция также была связана с дефицитом связанного азота и низким содержанием кислорода (Polman, Larkin, 1988).

### 1.6 Дыхательная цепь и другие доноры и акцепторы электронов

Способность *Beggiatoaceae* существовать в резких редокс-градиентах связана с перестройкой терминальных звеньев дыхания. Классические биохимические исследования *B. alba* выявили цитохромы типов *a*, *b* и *c* и убихинон, однако для понимания физиологии важнее не состав отдельных переносчиков, а изменение терминального участка дыхательной цепи в зависимости от условий. У *B. leptomitiformis* D-402 при гетеротрофном росте преобладала *aa3*-оксидаза, тогда как при миксотрофном, литогетеротрофном и автотрофном росте ее синтез подавлялся и возрастала роль *cbb3*-оксидазы, индуцируемой в микроаэробных условиях (Muntyan *et*

*al.*, 2005). Такая перестройка согласует дыхание с изменением доступности кислорода и типа энергетического субстрата.

У отдельных представителей семейства набор используемых доноров и акцепторов электронов не ограничивается восстановленными соединениями серы как донорами и кислородом или нитратом как акцепторами. Штамм *Beggiatoa* sp. 35Flor способен аэробно окислять  $H_2$ ; добавление водорода увеличивало биомассу, однако без восстановленных соединений серы  $H_2$  сам по себе рост не поддерживал. В анаэробных условиях потребление  $H_2$  предположительно было сопряжено с восстановлением запасенной элементной серы (Kreutzmann, Schulz-Vogt, 2016). У природных *Thiomargarita* spp. добавление  $H_2$  в анаэробных условиях вызывало повышение внутриклеточной оксидоредуктазной активности. Эти данные допускают использование  $H_2$  как донора электронов, но не доказывают рост или фиксацию  $CO_2$  за его счет (Bailey *et al.*, 2017). У *T. pseudosensis* физиологически показан анаэробный рост с диметилсульфоксидом или фумаратом как терминальными акцепторами электронов, тогда как нитрат и сульфат в этих условиях рост не поддерживали (Gureeva *et al.*, 2019).

### 1.7 Заключение по обзору литературы

Семейство *Beggiatoaceae* объединяет морфологически и метаболически разнообразную группу сероокисляющих бактерий, распространенных в различных местообитаниях с выраженными градиентами восстановленных соединений серы и кислорода. Представители семейства обнаружены в пресноводных и морских осадках, прибрежных зонах, гиперсоленых местообитаниях, холодных сипах и гидротермальных системах. Такое разнообразие условий существования отражается в широком спектре морфологических адаптаций: от подвижных нитчатых трихомов *Beggiatoa* и *Thioploca* до крупных вакуолизированных клеток *Thiomargarita* и родственных линий. Эти особенности обеспечивают возможность перемещения в пределах редокс-градиентов, накопления соединений серы и азота и разделения во времени процессов получения и использования субстратов.

История изучения систематики *Beggiatoaceae* показывает переход от классификации, основанной преимущественно на морфологических признаках, к филогенетическим и филогеномным подходам. Современные исследования значительно расширили представление о разнообразии семейства, выявив большое количество линий, не представленных среди формально описанных таксонов. При этом

сохраняется разрыв между геномным разнообразием, морфологическими характеристиками, физиологическими особенностями и существующей номенклатурой.

Метаболизм представителей *Beggiatoaceae* характеризуется высокой пластичностью. Центральное место занимает окисление восстановленных соединений серы, которое у разных линий реализуется через различные комбинации ферментных систем и сопровождается образованием внутриклеточной элементной серы и/или ее дальнейшим превращением. Одновременно представители семейства демонстрируют разнообразные стратегии углеродного и азотного обмена, включая сочетание хемоавтотрофии, миксотрофии и гетеротрофии, использование различных форм азота и способность формировать внутриклеточные резервы. Такое метаболическое разнообразие позволяет представителям семейства существовать в условиях изменяющейся доступности доноров и акцепторов электронов.

Несмотря на значительный объем накопленных данных, ряд ключевых аспектов биологии семейства остается недостаточно изученным. В частности, недостаточно понятно, каким образом организовано хранение и последующее использование внутриклеточной серы после ее образования, как структурные компоненты серных глобул участвуют в этом процессе и какие механизмы обеспечивают мобилизацию запасенной  $S^0$  у различных представителей. Ограниченное количество чистых культур также затрудняет функциональную проверку геномных данных и установление связи между потенциальными метаболическими возможностями и реальными физиологическими процессами.

Физиологическая и биохимическая характеристика многих выявленных метаболических возможностей пока остается фрагментарной. Особенно это относится к механизмам накопления и дальнейшего превращения внутриклеточной элементной серы. Сочетание филогеномных, физиологических, биохимических и экологических исследований позволит точнее охарактеризовать таксономическое и функциональное разнообразие семейства *Beggiatoaceae* и их роль в биогеохимических циклах.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объект исследования

Объектом исследования служили штаммы *B. leptomitiformis* 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).

### 2.2 Состав питательных сред

Штаммы *B. leptomitiformis* D-401 и D-402 культивировали в различных условиях с использованием среды следующего минерального состава (г·л<sup>-1</sup>): NaNO<sub>3</sub> — 0,62; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 0,125; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O — 0,3; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — 0,5; KCl — 0,125; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O — 0,5; NaHCO<sub>3</sub> — 0,125. Перед посевом pH среды доводили до 7,0. Перед культивированием в среду добавляли по 1 мл раствора витаминов (тиамин (B1), биотин (B7) и кобаламин (B12)) и 1 мл раствора микроэлементов (Pfennig, Lippert, 1966). Культуру инкубировали при 27 °С.

Для хемолитоавтотрофного роста в присутствии восстановленных соединений серы в среду в качестве донора электронов для энергетического метаболизма добавляли тиосульфат натрия (1,0 г/л Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O) или сульфид натрия (0,6 г/л Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O). При культивировании с добавлением сульфида натрия использовали метод градиентных сред. Нижний слой представлял собой агаровый столбик с концентрацией агара 15 г/л, содержащий 0,6 г/л Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O; верхний слой состоял из питательной среды указанного выше состава. Культивирование проводили во флаконах объемом 0,5 л. Высота нижнего слоя составляла 3–4 см, верхнего — 7–8 см.

Хемолитоавтотрофный рост штамма *B. leptomitiformis* D-402 в присутствии внутриклеточной элементной серы инициировали внесением инокулята из среды, содержащей сульфид натрия в качестве источника энергии, в обедненную минеральную среду, содержащую только 0,5 г/л NaHCO<sub>3</sub> в качестве источника неорганического углерода. При инокуляции такой среды клетками *B. leptomitiformis* D-402 внутриклеточная элементная сера служила донором электронов для энергетического метаболизма. Для удаления следовых количеств энергетического субстрата проводили два последовательных пассажа. В этих условиях

ко второму пассажу единственным возможным энергетическим субстратом или его предшественником оставалась внутриклеточная сера. Отсутствие следов сульфида натрия в среде подтверждали йодометрическим титрованием (American Public Health Association *et al.*, 2005). Наличие внутриклеточной серы определяли визуально.

Для хемолитогетеротрофного роста в минеральную среду добавляли  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  и лактат в концентрациях 1,0 и 0,25 г/л соответственно. Хемоорганогетеротрофный рост *B. leptomitiformis* инициировали добавлением 0,25 г/л лактата в минеральную среду.

## 2.3 Протеомный анализ

### 2.3.1 Протеомный анализ при исследовании белков оболочки серных глобул

Для протеомного анализа использовали клетки штаммов *B. leptomitiformis* D-401 и D-402, культивированных в присутствии тиосульфата и лактата.

#### 2.3.1.1 Подготовка образцов для двумерного гель-электрофореза

Клетки ресуспендировали в 200 мкл буфера для лизиса, содержащего 1 % дитиотреитола, 4 % CHAPS (3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат), 7 М мочевины, 2 М тиомочевины и 5 % амфолитов 3/10. Лизат получали с использованием гомогенизатора Поттера. Гомогенат центрифугировали при  $5000 \times g$  в течение 10 мин при 20 °C, после чего собирали супернатант. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда с использованием коммерческого набора Coomassie Protein Assay Reagent (Thermo Fisher, США) согласно инструкции производителя.

#### 2.3.1.2 Двумерный гель-электрофорез

Двумерный электрофорез проводили, как описано в O'Farrell (1975), с использованием системы PROTEAN II xi 2-D Cell (Bio-Rad, США).

При изоэлектрическом фокусировании использовали градиент pH от 3 до 10 (сервалиты, Serva Electrophoresis GmbH, Германия). На одну пробирку вносили 120 мкг белка. Изоэлектрофокусирование проводили в течение 16 ч в следующих режимах: 100 В — 45 мин, 200 В — 45 мин, 300 В — 45 мин, 400 В — 45 мин, 500 В — 45 мин, 600 В — 45 мин, 700 В — 10 ч и 900 В — 1,5 ч.

Электрофорез образцов после изоэлектрофокусирования проводили в градиентном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS) (7,5–25 %)

при напряжении 300 В. Перед нанесением во втором направлении образцы инкубировали в течение 20 мин в растворе, содержащем дитиотреитол (6 М мочевины, 2 % SDS, 10 мМ дитиотреитола, 0,5 М Tris-HCl, pH 6,8) для предотвращения окисления сульфгидрильных групп белков. Для визуального анализа распределения белковых компонентов и последующего масс-спектрометрического анализа гели окрашивали раствором Brilliant Blue R Staining Solution (Sigma, США).

Для получения белковых карт использовали систему документирования гелей Infinity1000/26MX (Vilber Lourmat, Франция).

#### 2.3.1.3 Подготовка белковых пятен для анализа методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной tandemной масс-спектрометрией

После анализа электрофореграмм порядка 10 индивидуальных белковых пятен вырезали из полиакриламидного геля и подвергали внутригелевому протеолитическому гидролизу трипсином для последующего анализа методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной tandemной масс-спектрометрией (MALDI-TOF/TOF-MS; англ. matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry) (Shevchenko *et al.*, 1996). Фрагменты геля трижды промывали деионизованной водой для удаления красителя, после чего обесцвечивали в течение 20 мин при 56 °С в растворе, содержащем 50 % ацетонитрила в 100 мМ гидрокарбонате аммония, pH 8,9. Затем фрагменты геля обезвоживали в 100 % ацетонитриле в течение 20 мин.

К обезвоженным фрагментам геля добавляли  $6,3 \pm 2,0$  мкл раствора модифицированного трипсина (Promega, США) с концентрацией 25 нг/мкл в 50 мМ гидрокарбонате аммония. Объем раствора трипсина подбирали в зависимости от количества белка в анализируемом фрагменте геля. Протеолитический гидролиз проводили в течение ночи при 37 °С. После завершения гидролиза к каждому фрагменту добавляли 15 мкл 0,7 % трифторуксусной кислоты и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Полученный пептидный экстракт использовали для масс-спектрометрического анализа (Petushkova *et al.*, 2015).

#### 2.3.1.4 Идентификация белков методом MALDI-TOF/TOF-MS

Для анализа 1 мкл пептидного экстракта наносили на MALDI-мишень MTP 600/384 AnchorChip (Bruker Daltonics, Германия) и смешивали непосредственно на

мишени с 1 мкл раствора матрицы, содержащего 20 мг/мл 2,5-дигидроксibenзойной кислоты в 20 % ацетонитриле и 0,1 % трифторуксусной кислоты. Полученную смесь высушивали на воздухе при комнатной температуре (Petushkova *et al.*, 2015).

Масс-спектры регистрировали на времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Германия) в режиме положительных ионов с рефлектроном и задержанной экстракцией. Ускоряющее напряжение составляло 25 кВ, время задержки экстракции — 135 нс. Для получения одного масс-спектра суммировали сигналы 100 лазерных импульсов (Petushkova *et al.*, 2015).

Для дополнительного подтверждения идентификации отдельных пептидов регистрировали тандемные масс-спектры в режиме TOF/TOF. Фрагментные спектры получали посредством лазер-индуцированной диссоциации с дополнительной низкоэнергетической столкновительно-индуцированной диссоциацией с использованием гелия в качестве газа столкновений (Fisunov *et al.*, 2011).

#### 2.3.1.5 Обработка масс-спектрометрических данных

Обработку масс-спектров проводили с использованием программного обеспечения FlexAnalysis 2.0 (Bruker Daltonics, Германия). Списки моноизотопных пиков формировали с использованием алгоритма SNAP (англ. sophisticated numerical annotation procedure); для дальнейшего анализа использовали сигналы с отношением сигнал/шум более 6. Внутреннюю калибровку масс-спектров проводили по продуктам автолиза трипсина с  $m/z$  842,5094 и 2211,1046 (Petushkova *et al.*, 2015).

Первичную идентификацию белков проводили методом пептидного масс-фингерпринтинга (PMF; англ. peptide mass fingerprint) с использованием поисковой системы Mascot (Matrix Science, Великобритания). Поиск выполняли в базе данных NCBI (англ. National Center for Biotechnology Information) с ограничением таксономической группы Bacteria, а также в локальной базе Mascot. При поиске задавали ферментативную специфичность Trypsin/P, использовали моноизотопные значения масс и однозарядные пептидные ионы. В зависимости от анализируемого спектра допустимое отклонение массы пептидов составляло  $\pm 30$ –80 ppm; допускалось наличие двух или трех пропущенных сайтов расщепления.

В качестве основных варьируемых модификаций при PMF-поиске учитывали окисление метионина (M) и пропионамидирование цистеина (C). В отдельных поисках

дополнительно учитывали дегидрирование цистеина (C) и фосфорилирование остатков серина и треонина (ST).

Поиск по тандемным масс-спектрам проводили в Mascot в режиме MS/MS Ion Search. В качестве ферментативной специфичности задавали полуспецифичное расщепление трипсином и допускали до трех пропущенных сайтов расщепления. Использовали моноизотопные значения масс. Допустимое отклонение массы иона-предшественника составляло  $\pm 30$  ppm, а фрагментных ионов —  $\pm 2$  Да. В качестве переменных модификаций учитывали окисление метионина (M), окисление гистидина и триптофана (HW) и пропионамидирование цистеина (C).

#### 2.3.1.6 Подготовка образцов для высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС)

Белки штаммов D-401 и D-402 подвергали расщеплению трипсином (Promega, США) и химотрипсином (Promega, США) в соответствии с протоколом фильтрационной подготовки образцов (FASP; англ. filter-aided sample preparation) на фильтрах с порогом отсека по молекулярной массе 10 кДа (MWCO; англ. molecular weight cut-off) (Microcon Centrifugal Filter 10 kDa, Millipore, США), как описано ранее (Anselm *et al.*, 2017).

#### 2.3.1.7 Анализ методом ВЭЖХ-МС/МС

Пептиды разделяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на системе Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Scientific, США) на C18-колонке длиной 15 см с внутренним диаметром 75 мкм (Acclaim PepMap RSLC, Thermo Fisher Scientific, США). Пептиды элюировали градиентом буфера В (80 % ацетонитрила, 0,1 % муравьиной кислоты) при скорости потока 0,3 мкл·мин<sup>-1</sup>. Общее время анализа составляло 90 мин, включая начальные 4 мин уравнивания колонки буфером А (0,1 % муравьиной кислоты), затем градиент от 5 до 35 % буфера В в течение 65 мин, далее 6 мин до достижения 99 % буфера В, промывку в течение 10 мин 99 % буфером В и 5 мин повторного уравнивания буфером А.

Масс-спектрометрический анализ проводили в трех повторностях на масс-спектрометре Q Exactive HF (Q Exactive HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass spectrometer, Thermo Fisher Scientific, США). Масс-спектры регистрировали с разрешением 120 000 для обзорных спектров первого уровня (MS1) и 15 000 для

спектров второго уровня (MS<sup>2</sup>) в диапазонах  $m/z$  350–1500 и 100–2000 соответственно. Для отбора прекурсоров был установлен порог изоляции 100 000 отсчетов, и 10 наиболее интенсивных прекурсоров выбирали для фрагментации методом высокоэнергетической диссоциации при столкновении с нормализованной энергией столкновения (NCE; англ. *normalized collision energy*), равной 30, и временем накопления 100 мс. Прекурсоры с зарядовым состоянием +1 исключали, а все ранее измеренные прекурсоры исключали из измерения на 20 с.

#### 2.3.1.8 Обработка данных протеомного анализа

Белки штаммов идентифицировали с использованием программы SearchGUI v.3.3.17 с одновременным применением алгоритмов X!Tandem, OMSSA (Open Mass Spectrometry Search Algorithm) и MS-GF+ (Mass Spectrometry Generating Function Plus) (Barsnes, Vaudel, 2018) и баз данных белковых последовательностей TrEMBL *B. leptomitiformis* D-401 (3445 записей) и *B. leptomitiformis* D-402 (3447 записей). Параметры были заданы следующим образом: отсутствие специфичности фермента; допуск для MS — 5 ppm и допуск 0,01 Да для ионов MS/MS; карбамидометилирование цистеина (C) в качестве фиксированной модификации и окисление метионина (M) в качестве вариабельной модификации.

Результаты SearchGUI анализировали и визуализировали в программе PeptideShaker (Vaudel *et al.*, 2015) v.1.16.44. Соответствия «пептид–спектр», пептиды и белки валидировали при уровне ложных обнаружений 1,0 %, рассчитанном на основе распределения ложных совпадений. Только белки, содержащие не менее двух уникальных пептидов, считали положительно идентифицированными.

#### 2.3.2 Протеомный анализ при исследовании превращения внутриклеточной элементной серы *B. leptomitiformis* D-402

Для протеомного анализа использовали клетки штамма D-402, выращенные на обедненной минеральной среде с внутриклеточной элементной серой в качестве потенциального донора электронов для энергетического метаболизма и NaHCO<sub>3</sub> в качестве источника углерода; экспериментальные образцы отбирали на 7-е сутки культивирования. В качестве контрольных образцов использовали культуры штамма D-402, выращенные хемолитогетеротрофно в присутствии тиосульфата и лактата и органоетеротрофно в присутствии лактата.

### 2.3.2.1 Подготовка образцов для ВЭЖХ-МС/МС

Образцы подвергали ультразвуковой обработке на льду в импульсном режиме в течение 30 с в буфере триэтиламмонийгидрокарбоната, содержащем 4 % SDS. Гомогенат центрифугировали при  $14\,000 \times g$  в течение 10 мин при 10 °C. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда на спектрофотометре Evolution 260 Bio (Thermo Fisher Scientific, США). Подготовку образцов проводили методом улавливания белков из суспензии на фильтре S-trap (англ. suspension trapping) с использованием 5 % SDS (Zougman *et al.*, 2014).

### 2.3.2.2 Анализ методом ВЭЖХ-МС/МС

Масс-спектрометрический анализ образцов после гидролиза выполняли с использованием хроматографической системы Ultimate 3000 RSLCnano HPLC (Thermo Fisher Scientific, США), сопряженной с масс-спектрометром Q-Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific, США).

Хроматографическое разделение пептидов проводили на аналитической обращенно-фазовой колонке Acclaim Pepmap® C18 длиной 15 см и внутренним диаметром 75 мкм (Thermo Fisher Scientific, США). Градиент формировали с использованием подвижной фазы А (0,1 % муравьиной кислоты в деионизованной воде) и подвижной фазы В (80 % ацетонитрила, 0,1 % муравьиной кислоты в деионизованной воде) от 5 до 30 % в течение 70 мин при скорости потока  $0,4 \text{ мкл} \cdot \text{мин}^{-1}$  с последующим уравниванием хроматографической системы в исходных условиях градиента (А:В = 95:5) в течение 8 мин.

Масс-спектрометрический анализ проводили в четырех повторностях на масс-спектрометре Q-Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме положительной ионизации с использованием источника наноэлектроспрейной ионизации. Масс-спектры регистрировали с разрешением 60 000 (MS1) и 15 000 (MS2) в диапазонах  $m/z$  375–1300 и 200–2000 соответственно. Для отбора прекурсоров использовали порог изоляции 50 000 отсчетов; для фрагментации методом высокоэнергетической диссоциации при столкновении выбирали 10 наиболее интенсивных прекурсоров при 29 NCE и времени накопления 100 мс. Прекурсоры с зарядом +1 исключали, а все ранее измеренные прекурсоры исключали из повторного анализа на 10 с. Максимальное время накопления составляло 50 мс для ионов-прекурсоров и 150 мс для фрагментных ионов.

### 2.3.2.3 Обработка данных протеомного анализа

Идентификацию белков проводили с использованием программы MaxQuant v.1.6.17.0 с поисковым алгоритмом Andromeda (Cox, Mann, 2011). Для идентификации белков использовали базу данных UniProt (Swiss-Prot) для *B. leptomitiformis* D-402. Были заданы следующие параметры: протеолитическим ферментом являлся трипсин; точность определения массы моноизотопных пептидов составляла  $\pm 5$  ppm; точность масс-спектров MS/MS —  $\pm 0,01$  Да; допускалось наличие двух пропущенных сайтов расщепления трипсином.

Модификацию цистеина хлорацетамидом рассматривали как фиксированную модификацию пептидов, тогда как окисление метионина и N-концевое ацетилирование — как вариабельные модификации. Для валидации соответствий «пептид–спектр», идентификации пептидов и белков использовали пороговое значение доли ложных обнаружений не более 1,0 %. Надежно идентифицированными считали белки, для которых было обнаружено не менее двух пептидов. Безметочная количественная оценка содержания белков основывалась на показателях интенсивностно-ориентированной абсолютной количественной оценки (iBAQ; англ. intensity-based absolute quantification) и безметочного количественного анализа (LFQ; англ. label-free quantification).

Статистический анализ данных, полученных при идентификации, проводили в программе Perseus v.1.6.15.0. Предварительно данные фильтровали для отбора наиболее значимых точек: удаляли возможные контаминантные белки и ненадежно идентифицированные белки.

Для выделения значимых различий между белками образцов список белков дополнительно фильтровали; сохраняли только белки, обнаруженные как минимум в двух из четырех повторностей анализа.

## 2.4 Исследование персульфиддиоксигеназы PDO

### 2.4.1 Получение рекомбинантного белка PDO

#### 2.4.1.1 Клонирование гена *pdoI*

Геномную ДНК выделяли с использованием набора diaGene Kit (Диаэм, Россия) согласно инструкции производителя. Ген персульфиддиоксигеназы был идентифицирован в аннотированной последовательности генома *B. leptomitiformis* и проанализирован с использованием BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и

InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Ген PDO амплифицировали из геномной ДНК методом полимеразной цепной реакции с использованием смеси BlitzMasterMix (Belbiolabs, Россия). Для амплификации использовали прямой праймер PdoIFe\_Nde (5'–AGTCATATGATTTTTCAACAATTATTTGAGTCTAG–3') и обратный праймер PdoIRe\_Xho\_22 (5'–АТАТСТСГАГСАССАГТГТТТСАТААСТГ–3'). Программа ПЦР-амплификации была следующей: 98 °С, 30" + [(98 °С, 10" + 50 °С, 30" + 72 °С, 1') × 35] + 72 °С, 2'. ПЦР-продукт соответствующего размера очищали с использованием набора diaGene Kit (Диаэм, Россия), а последовательность гена подтверждали секвенированием.

Для клонирования гена в экспрессионный вектор pET-22b(+) по сайтам рестрикции эндонуклеаз NdeI и XhoI плазмиду и ПЦР-продукт обрабатывали соответствующими рестрикционными эндонуклеазами (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Затем реакцию лигирования вектора и ампликона проводили при +15 °С с использованием T4 ДНК-лигазы (Thermo Fisher Scientific, США). Компетентные клетки *Escherichia coli* DH5α трансформировали лигазной смесью, содержащей конструкцию pET22b::*pdoI*. Плазмиды с целевым геном выделяли из ночной культуры трансформантов. Последовательность встроенного гена *pdoI* проверяли секвенированием на отсутствие мутаций.

#### 2.4.1.2 Рекомбинантная экспрессия и очистка

Для получения рекомбинантного PDO штамм *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) трансформировали плазмидой pET22b::*pdoI* и культивировали при 37 °С и перемешивании со скоростью 250 об/мин до достижения оптической плотности культуры 0,6–0,8 при 600 нм (A600). Затем в культуральную среду добавляли 0,9 мМ изопропил-β-D-тиогалактопиранозид, после чего культуру инкубировали в течение 18 ч при 16 °С и перемешивании со скоростью 100 об/мин.

Клетки осаждали центрифугированием при 4000 × g в течение 20 мин, ресуспендировали в 35 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,5), содержащего 0,5 М NaCl и 1 мМ имидазола (буфер 1), с добавлением ингибиторов протеаз (1 мМ ε-аминокапроновой кислоты, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида и 1 мМ бензамидина), после чего разрушали ультразвуком. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием (90 мин при 12 000 × g), после чего белок очищали методом аффинной хроматографии на колонке HisTrap 5 мл (GE Healthcare, США).

Клеточный экстракт наносили на колонку HisTrap, предварительно уравновешенную буфером 1, затем промывали пятью объемами буфера 1 и далее пятью объемами буфера 2 (50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,5), 0,5 М NaCl, 50 мМ имидазола). Фракции, содержащие фермент, элюировали буфером 3 (50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,5), 0,5 М NaCl, 300 мМ имидазола). После стадии хроматографии белок диализовали против 50 мМ калий-фосфатного буфера, pH 7,5.

Концентрацию белка определяли по молярному коэффициенту экстинкции при 280 нм ( $\epsilon = 15\,040\text{ М}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ ), рассчитанному по аминокислотной последовательности белка с использованием программы Vector NTI (Life Technologies, США). Молекулярную массу фермента определяли методом электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (Laemmli, 1970).

## 2.4.2 Функциональная характеристика рекомбинантного PDO

### 2.4.2.1 Определение активности PDO

Активность PDO определяли ранее описанным методом (Suzuki, 1965), основанным на регистрации потребления кислорода (Xin *et al.*, 2016), с модификациями. Скорость потребления  $\text{O}_2$  измеряли с помощью электрода Кларка в ячейке объемом 1 мл (Hansatech Instruments Ltd., Великобритания) при 35 °C (если не указано иное) в реакционной среде, содержащей смесь 50 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,0) и глутатионперсульфида (GSSH) в соотношении 1:1.

GSSH получали смешиванием равных объемов 17 мМ восстановленного глутатиона в дистиллированной воде и насыщенного раствора серы, содержащего около 17 мМ элементной серы (Visser *et al.*, 1997). Перед измерением реакционную смесь предварительно инкубировали в течение 1 мин в ячейке, закрытой крышкой; после этого в течение 140 с регистрировали неферментативное изменение уровня  $\text{O}_2$ .

Ферментативную реакцию инициировали добавлением PDO через канал в крышке камеры с использованием наконечника для загрузки геля. Перед измерениями смесь GSSH и PDO выдерживали на льду. Для расчета максимальной скорости потребления  $\text{O}_2$  выбирали линейный участок кривой. Концентрация фермента в ячейке составляла 30 мкг.

Калибровку электрода проводили добавлением нескольких кристаллов дитионита, при этом концентрацию растворенного  $\text{O}_2$  принимали равной 219 мкМ

(219 нмоль·мл<sup>-1</sup>). Скорость потребления O<sub>2</sub> определяли в мкмоль O<sub>2</sub>·мг<sup>-1</sup>·ч<sup>-1</sup>. За одну единицу активности PDO (1 U) принимали потребление 1 нмоль O<sub>2</sub> в минуту; удельную активность фермента выражали в U·мг<sup>-1</sup> белка (Ran *et al.*, 2022).

#### 2.4.2.2 Биохимические характеристики PDO

Влияние pH и температуры на активность и стабильность PDO исследовали с использованием GSSH в качестве субстрата. Оптимум pH активности PDO определяли в диапазоне от 6,0 до 8,0 с шагом 0,5 единицы при 35 °C в 50 mM калий-фосфатном буфере. Температурный оптимум активности фермента определяли в диапазоне от 25 °C до 55 °C с шагом 5 °C в 50 mM калий-фосфатном буфере, pH 7,0.

Термостабильность PDO оценивали по остаточной активности фермента после одночасовой инкубации при 30 °C, 40 °C, 45 °C и 50 °C в том же буфере при pH 7,0. Стабильность фермента при различных значениях pH определяли путем инкубации белка в 50 mM калий-фосфатном буфере в условиях охлаждения в течение недели в диапазоне pH от 6,0 до 11,0 с шагом 1,0 единица. Остаточную активность определяли в 50 mM калий-фосфатном буфере (pH 7,0) при 35 °C с использованием GSSH в качестве субстрата.

Ингибирование активности фермента исследовали с использованием ионов металлов (Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>) и этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), определяя активность PDO, как описано выше, в присутствии каждого реагента в концентрации 1 mM в 50 mM калий-фосфатном буфере (pH 7,0) при 35 °C (Wu *et al.*, 2017).

Биохимические измерения проводили в трех повторностях. Результаты представляли в виде среднего арифметического значения и стандартного отклонения.

### 2.4.3 Структурный анализ рекомбинантного PDO

#### 2.4.3.1 Кристаллизация

Эксперименты по кристаллизации проводили при 22 °C методом диффузии паров в висячей капле на силиконизированных стеклянных покровных стеклах в планшетах Linbro (Molecular Dimensions Ltd., Великобритания).

Капли для кристаллизации готовили смешиванием 1 мкл раствора белка в концентрации 10 мг/мл в 50 mM калий-фосфатном буфере (pH 7,0), содержащем 100 mM NaCl и 1 мкл раствора резервуара. Кристаллы PDO были получены в условиях,

содержащих 8 % (масса/объем) полиэтиленгликоля 4000 (PEG 4000) и 0,2 М имидазол-малата, pH 6,0 (условие №13 набора Stura Footprint Screen-2, Molecular Dimensions Ltd., Великобритания).

Перед мгновенным замораживанием отдельный кристалл выдерживали в криорастворе, состоящем из 25,5 % (масса/объем) PEG 4000, 15 % глицерина, 0,085 М цитрата натрия (pH 5,6) и 0,17 М ацетата аммония (условие №9 набора Crystal Screen Cryo, Hampton Research, США).

#### 2.4.3.2 Кристаллография

Дифракционные данные кристалла PDO были собраны на станции BL18U1 синхротронного источника SSRF (англ. Shanghai Synchrotron Radiation Facility, Китай). Набор отражений обрабатывали с использованием программы XDS (Kabsch, 2010).

Структуры определяли методом молекулярного замещения с использованием программы Phaser (McCoey *et al.*, 2007); в качестве поисковой модели использовали структуру белка hETHE1 человека, определенную с разрешением 2,6 Å (идентификатор PDB 4CHL). Из модели были удалены молекулы воды и ионы металлов. Начальную модель подвергали кристаллографическому уточнению с помощью REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 2011). Ручную перестройку модели выполняли в программе Coot (Emsley *et al.*, 2010). Финальный цикл уточнения структуры, включавший уточнение заселенности атомов, проводили в программе Phenix (Liebschner *et al.*, 2019).

Статистика обработки данных и уточнения структуры приведена в Таблице 1. Координаты атомов и структурные факторы депонированы в PDB (англ. Protein Data Bank; <http://wwpdb.org/>). Рисунки были подготовлены с использованием программы PyMOL (Schrödinger, DeLano, 2020; <https://www.pymol.org/2/>, дата обращения: 20.10.2023).

**Таблица 1 — Статистика сбора кристаллографических данных и уточнения структуры (цит. по Rudenko *et al.*, 2024)**

| Сбор данных                                      |                                  |
|--------------------------------------------------|----------------------------------|
| Длина волны (Å)                                  | 0,97853                          |
| Диапазон разрешения (Å)                          | 50,00–2,33<br>(2,47–2,33)        |
| Пространственная группа                          | P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 |
| Параметры элементарной ячейки                    |                                  |
| a, b, c (Å)                                      | 66,9, 66,9, 245,0                |
| $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)                | 90,0, 90,0, 90,0                 |
| Температура сбора данных (K)                     | 100                              |
| Общее число отражений                            | 248 845 (38 956)                 |
| Число уникальных отражений                       | 24 873 (3845)                    |
| R <sub>merge</sub> (%)                           | 25,7 (173,2)                     |
| Кратность отражений                              | 10,00 (10,13)                    |
| Полнота данных (%)                               | 99,6 (97,9)                      |
| Среднее I/sigma (I)                              | 10,13 (1,70)                     |
| В-фактор Вильсона (Å <sup>2</sup> )              | 31,7                             |
| CC <sub>1/2</sub>                                | 0,99 (0,72)                      |
| Уточнение структуры                              |                                  |
| Диапазон разрешения                              | 46,51–2,33<br>(2,42–2,33)        |
| Число отражений, использованных при уточнении    | 24 834 (2491)                    |
| Число отражений, использованных для R-free       | 1205 (129)                       |
| R-work, %                                        | 18,92 (26,62)                    |
| R-free, %                                        | 24,60 (33,19)                    |
| RMSD длин связей (Å)                             | 0,008                            |
| RMSD валентных углов (°)                         | 0,984                            |
| Благоприятные области диаграммы Рамачандрана (%) | 98,28                            |
| Допустимые области диаграммы Рамачандрана (%)    | 1,72                             |
| Выбросы на диаграмме Рамачандрана (%)            | 0,00                             |
| Средний В-фактор (Å <sup>2</sup> )               | 33,88                            |
| Макромолекулы                                    | 33,99                            |
| Лиганды                                          | 33,28                            |
| Растворитель                                     | 29,91                            |
| PDB ID                                           | 8ZBD                             |

R<sub>merge</sub> — фактор сходимости эквивалентных отражений; R-free — R-фактор для контрольного набора отражений, не использованного при уточнении структуры; R-work — R-фактор для рабочего набора отражений; RMSD — среднеквадратичное отклонение.

## 2.5 Анализ экспрессии генов

Экспрессию генов *soxAX*, *soxB*, *soxY*, *soxZ* и *pdo* анализировали при хемолитоавтотрофном росте, когда в качестве донора электронов для энергетического метаболизма использовали сульфид натрия или внутриклеточную элементную серу, а гидрокарбонат натрия использовали в качестве источника неорганического углерода.

При хемолитогетеротрофном росте в присутствии тиосульфата и лактата анализировали экспрессию генов *soxA*X, *soxB*, *soxY* и *soxZ*, а также генов, кодирующих белки ALG67575.1, ALG68134.1 и ALG67202.2. Хемоорганогетеротрофный рост в присутствии лактата использовали в качестве контрольных условий. В качестве референсных генов использовали ген субъединицы В ДНК-гиразы *gyrB* и ген 16S рРНК *rrs*.

РНК выделяли с использованием реагента ExtractRNA (Evrogen, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Качество РНК оценивали электрофорезом в 1,1%-ном агарозном геле с добавлением 2,2 М формальдегида. Концентрацию РНК измеряли с использованием набора HS Equalbit RNA assay kit (Vazyme, Китай) на флуориметре Fluo-200 (Allsheng, Китай). Затем 2000 нг РНК подвергали обратной транскрипции с использованием M-MuLV (SybEnzyme, Россия) согласно протоколу производителя. ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени проводили с использованием SYBR Green I на системе детекции ПЦР в реальном времени Bio-Rad CFX96 touch (Bio-Rad, США).

Пары праймеров подбирали с близкими расчетными температурами плавления. Для определения общей оптимальной температуры отжига использовали температурный градиент. Последовательности праймеров и выбранная температура отжига приведены в Таблице 2. Для всех пар праймеров использовали единую температуру отжига 60 °С.

Все целевые и референсные гены амплифицировали по единой программе: 95 °С, 5' + [(95 °С, 20" + 60 °С, 20" + 72 °С, 15") × 39]. Эффективность амплификации определяли для каждой пары праймеров по стандартным кривым, построенным с использованием последовательных разведений кДНК. Специфичность образующихся продуктов оценивали по кривым плавления.

Эксперименты по анализу экспрессии генов проводили в трех независимых биологических повторах; для каждого биологического повтора ОТ-ПЦР в реальном времени выполняли в пяти технических повторах. Значения технических повторов усредняли, а результаты представляли в виде среднего арифметического значения и стандартного отклонения, рассчитанных по трем биологическим повторам.

Все праймеры были разработаны с использованием PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

**Таблица 2 — Последовательности праймеров, использованные при ОТ-ПЦР в реальном времени (цит. по Rudenko *et al.*, 2020; Rudenko *et al.*, 2024)**

| Аmplифицируемая мишень | Прямой праймер (5'→3') | Обратный праймер (5'→3') |
|------------------------|------------------------|--------------------------|
| <i>rrs</i>             | TGGGCTGTACCAGAAGTAGGT  | GTTACGACTTCACCCCAGTCA    |
| <i>gyrB</i>            | ACGCATTTATTCAACGGGGC   | ACGGCGGGCTTCATTCATTA     |
| <i>soxAX</i>           | ATTTTCCACCTATCGCACCA   | TCGAATAGCGACACCACACC     |
| <i>soxB</i>            | CTCCCCGCAGACAAAGACAT   | CCGCGTCGATAAAGTAGGGT     |
| <i>soxY</i>            | AACCCTGTGCCTTTAGTCGC   | CAACAATCGCAACCACGTCA     |
| <i>soxZ</i>            | TACGGGCGAGTTGATTCCTG   | CGCTCCAAATGGCACTCATC     |
| <i>pdo</i>             | TTGCCCAAGAAAAACAGCGT   | TTTGCGCGGATTTGGTGTTT     |
| Ген белка ALG67575.1   | GGGGCAACAATGAATGGGGT   | GACGACCATAACCACGACCG     |
| Ген белка ALG68134.1   | GCTGAAAAATGGGACGCAGG   | TCACCCACGTTGCCATAACC     |
| Ген белка ALG67202.2   | CTTTGTGATTTGGGCGGCAA   | AGATGCGACAAGTGATGCGG     |

## 2.6 Количественное определение тиосульфата и сульфата

Сульфат и тиосульфат анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Stayer (Aquilon, Россия), оснащённом кондуктометрическим детектором. Разделение проводили в изократическом режиме при 35 °C на колонке Dionex IonPac AS22 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием буфера 4,5 мМ карбоната натрия/1,4 мМ гидрокарбоната натрия с добавлением 10 % метанола при скорости потока 1,0 мл·мин<sup>-1</sup>.

Колонка (250 × 4 мм, размер частиц 6 мкм) содержала матрицу поливинилбензиламмония, сшитую 55 % дивинилбензола, с четвертичным алканольным аммонием в качестве функциональной группы. Перед инъекцией образцы микробных суспензий освобождали от клеток центрифугированием при 15 000 × g в течение 15 мин.

Концентрации тиосульфата и сульфата определяли в трех параллельных измерениях. Результаты представляли в виде среднего арифметического значения и стандартного отклонения.

Изменения содержания серных включений в клетках *B. leptomitiformis* D-402 наблюдали визуально с использованием светового микроскопа Olympus CX31 HD (Olympus, Япония), оснащённого объективами AmScope Infinity Plan 100X/1.25 Oil (AmScope, США) с фазовым контрастом. Культуру штамма D-402 анализировали под

микроскопом как минимум в 30 полях зрения. Серные глобулы определяли как сильно преломляющие свет внутриклеточные включения сферической формы.

## **2.7 Секвенирование и полировка геномов штаммов D-401 и D-402**

ДНК выделяли с использованием набора FastDNA™ SpinKit (MP Biomedicals, США). Библиотеки готовили с использованием набора KAPA HyperPlus kit с адаптерами из набора KAPA Dual-Indexed Adapter Kit. Полученные библиотеки секвенировали на платформе Illumina MiSeq с чтениями  $2 \times 300$  нт.

Предобработку сырых данных секвенирования проводили с использованием программы Trimmomatic v.0.39 (Bolger *et al.*, 2014), после чего полученные ряды картировали на соответствующие геномные сборки с использованием Bowtie2 v.2.3.4.3 (Langmead, Salzberg, 2012). Коррекцию геномов выполняли с использованием Pilon v.1.23 (Walker *et al.*, 2014).

## **2.8 Исследование природных серных матов и получение MAG**

### **2.8.1 Отбор проб и физико-химическая характеристика мест отбора**

Пробы для метагеномного анализа были отобраны 7 августа 2023 года в заливе Белого моря «Ламинариевая помойка» вблизи Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова (Республика Карелия, Россия) с глубины 15 м ( $66^{\circ}34'16,94''$  с. ш.,  $33^{\circ}06'23,44''$  в. д.) при температуре морской воды  $14^{\circ}\text{C}$ . Были собраны две пробы талломов ламинарии с белесоватыми серными матами различной степени выраженности, обозначенные как Beg5 и Beg14.

Физико-химические параметры морской воды в местах отбора проб (pH, температура и окислительно-восстановительный потенциал) измеряли с помощью pH-метра HI18314F (Hanna Instruments, Германия). Концентрацию кислотолabileного сульфида в образцах определяли спектрофотометрическим методом с использованием р-фенилендиамина и прямым йодометрическим титрованием после предварительной фиксации сульфида 10%-ным ацетатом цинка. Концентрацию растворенного кислорода в среде определяли с помощью кислородомера HI 9142 (Hanna Instruments, Румыния). Общую минерализацию определяли кондуктометрическим методом с использованием кондуктометра Multitest KSL-101 (СЕМИКО, Россия).

### 2.8.2 Микроскопический анализ природных серных матов

Для визуального анализа крупных объектов при малом увеличении использовали бинокулярный микроскоп Nikon SMZ445 (Nikon, Япония). Анализ морфологии клеток полученных образцов серных матов проводили с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse Ei (Nikon, Япония), оснащенного объективами CFI BE2 PLAN 10×/0.25, CFI BE2 PLAN 40×/0.65 и CFI Plan Fluor DLL 100×/1.30 Oil с фазовым контрастом.

### 2.9 Метагеномное секвенирование и сборка MAG

Метагеномную ДНК из серных матов Beg5 и Beg14 выделяли и очищали с использованием набора Diatom DNA mini Prep 200 kit (Isogen Laboratories, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя с некоторыми модификациями: лизис подготовленных образцов в лизирующем буфере проводили в течение 45 мин при 65 °C с периодическим осторожным перемешиванием до полного растворения фрагментов матов и просветления смеси. Полученную ДНК секвенировали с использованием технологии Illumina. Библиотеки для секвенирования Illumina готовили с использованием набора NEBNext Ultra II DNA library preparation kit (New England Biolabs, США). Секвенирование этих библиотек на приборе Illumina MiSeq в парно-концевом формате (2 × 300 нт) дало в общей сложности около 3 Гб и 4,7 Гб последовательностей для образцов Beg5 и Beg14 соответственно. Низкокачественные концевые участки ридов (q = 30) обрезали с использованием программы Sickel v.1.33 (<https://github.com/najoshi/sickle>).

Риды Illumina собирали в контиги с использованием программ metaSPAdes v.3.15.4 (Nurk *et al.*, 2017) и MEGAHIT v.1.2.9 (Li *et al.*, 2015). Полученные контиги распределяли по MAG с использованием программ MaxBin v.2.2.7 (Wu *et al.*, 2016), CONCOCT v.1.0.0 (Alneberg *et al.*, 2014) и MetaBAT v.2.15 (Kang *et al.*, 2019). Результаты биннинга объединяли и оптимизировали с помощью DAS Tool (Dereplication, Aggregation, Scoring Tool) v.1.1.4 (Sieber *et al.*, 2018). Полученные MAG таксономически классифицировали с использованием GTDB-Tk (англ. Genome Taxonomy Database Toolkit) v.1.5.0 (Chaumeil *et al.*, 2019) и базы данных GTDB (Parks *et al.*, 2022). Для оценки полноты и контаминации полученных MAG использовали программу CheckM2 v.1.0.1 (Chklovski *et al.*, 2023).

Из каждого метагенома были собраны два MAG, таксономически отнесенные к кандидатным родам «BB20» и «UBA10656» семейства *Beggiatoaceae*. MAG одного и того же рода из двух метагеномов были идентичны, что указывало на присутствие одних и тех же двух генотипов *Beggiatoaceae* в обоих анализируемых матах. Поэтому для сборки этих MAG использовали разные наборы ридов.

С использованием полного набора ридов, полученных для обоих образцов, и программы metaSPAdes был собран MAG WS\_Bin3, представляющий линию «BB20». MAG WS\_Bin1 бактерии рода «UBA10656» был собран с использованием программы MEGAHIT из 35 % ридов, полученных для мата Beg14.

## 2.10 Геномный и филогенетический анализ

Поиск генов и их аннотацию проводили с использованием сервера RAST 2 (Brettin *et al.*, 2015) с последующей ручной корректировкой аннотаций путем сравнения предсказанных белковых последовательностей с базой данных NCBI. Поиск гомологичных белковых последовательностей проводили с использованием алгоритма BLASTP в базе данных NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Аминокислотные последовательности, а также нуклеотидные последовательности длинных вставок для последующего кластерного анализа выравнивали с использованием программы ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Филогенетические деревья строили методом присоединения соседей (Saitou, Nei, 1987) с использованием *p*-distance: дерево гомологичных белков — в программе MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021), а деревья для кластерного анализа длинных вставок — в программе MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Достоверность узлов ветвления оценивали методом bootstrap-анализа с построением 1000 альтернативных деревьев.

Субклеточную локализацию белков предсказывали с помощью инструмента PSORTb v3.0 (<http://www.psort.org/psortb/>, дата обращения: 15 мая 2023 г.). Наличие сигнальных пептидов определяли с использованием SignalP v.5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>, дата обращения: 15 мая 2023 г.) и InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>, дата обращения: 15 мая 2023 г.). Поиск консервативных доменов в белковых последовательностях выполняли с помощью базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

Значения средней нуклеотидной идентичности (ANI; англ. average nucleotide identity) рассчитывали с использованием онлайн-ресурса

(<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>, дата обращения: 8 февраля 2024 г.) на основе алгоритма OrthoANI с применением USEARCH (Lee *et al.*, 2016). Значения средней аминокислотной идентичности (AAI; англ. average amino acid identity) между геномами определяли с помощью скрипта *aa1.rb* из набора *enveomics* (Rodriguez-R, Konstantinidis, 2016). Для филогенетического анализа на основе геномов использовали GTDB-Tk v.1.5.0 (Chaumeil *et al.*, 2019) для идентификации 120 однокопийных маркерных генов в геномах и построения множественного выравнивания конкатенированных аминокислотных последовательностей. Дерево максимального правдоподобия строили на основе полученного выравнивания с использованием программы PhyML v.3.3 (Guindon *et al.*, 2010) с параметрами по умолчанию (модель аминокислотных замен LG, четыре категории скоростей замен, моделируемые дискретным гамма-распределением с оцениваемым параметром формы; поддержка ветвей рассчитывалась приближенным байесовским методом).

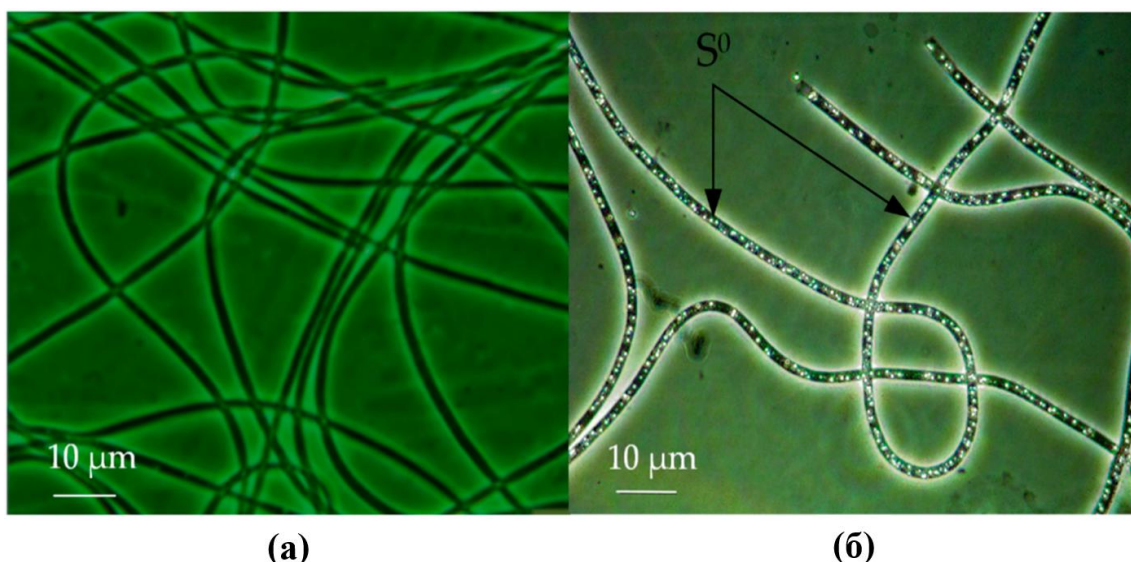
### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1 Установление причины утраты способности к накоплению внутриклеточной элементарной серы у штамма *B. leptomitiformis* D-401

##### 3.1.1 Уточнение геномных последовательностей и сравнительный анализ генов диссимиляционного метаболизма серы у штаммов *B. leptomitiformis* D-401 и D-402

Штаммы *B. leptomitiformis* D-401 и D-402<sup>T</sup> отличаются по способности реализовывать различные типы роста в присутствии восстановленных соединений серы и накапливать внутриклеточную элементарную серу. Оба штамма растут хемолитогетеротрофно при использовании тиосульфата или сероводорода в качестве доноров электронов для энергетического метаболизма и хемолитоавтотрофно при использовании сероводорода. В отличие от штамма D-402, штамм D-401 не способен к хемолитоавтотрофному росту в присутствии тиосульфата. Кроме того, ни при одном из исследованных условий роста в присутствии восстановленных соединений серы штамм D-401 не накапливает внутриклеточную элементарную серу, тогда как у штамма D-402 при использовании этих соединений накапливается внутриклеточная элементарная сера ( $S^0$ ), содержание которой может составлять 20–50 % сухой массы клеток (Grabovich *et al.*, 2001; Nelson, Castenholz, 1981) (Рисунок 6). При этом полные последовательности геномов обоих штаммов были получены ранее (Fomenkov *et al.*, 2018; Fomenkov *et al.*, 2015), а уровень их сходства превышает 99,5 % (Fomenkov *et al.*, 2018).

Для штамма D-402 ранее была проведена аннотация генома, включавшая характеристику ряда генов диссимиляционного метаболизма серы. Среди генов, связанных с окислением сульфида, были выявлены ген *sqr*, кодирующий сульфид:хиноноксидоредуктазу, а также ген, обозначенный в исходной аннотации как *soxF* и кодирующий флавопротеиновую субъединицу флавоцитохром-с-сульфиддегидрогеназы. По современной функциональной номенклатуре этот белок соответствует субъединице FccB. Кроме того, была выявлена разветвленная Sox-система окисления тиосульфата, представленная генами *soxAXBYZ* при отсутствии *soxCD*; при этом *soxX* кодировал гибридный белок SoxAX (Dubinina *et al.*, 2017).



**Рисунок 6 — Фазово-контрастные микрофотографии клеток *B. leptomitiformis* 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 последующем сравнительном исследовании геномов сероокисляющих бактерий для D-402 было показано наличие генов мембранной сульфит:хиноноксидоредуктазы *soeABC*. При этом гены *sorAB*, кодирующие субъединицы периплазматической сульфит:цитохром-с-оксидоредуктазы SorAB, а также гены APS-зависимого пути окисления сульфита *aprAB* (APS-редуктаза AprAB) и *sat* (АТР-сульфурилаза) выявлены не были. Полный набор генов Dsr-системы, включающий *dsrABEFHCKJOP*, а также полный набор генов Hdr-зависимого пути у D-402 выявлены не были (Watanabe *et al.*, 2019).

Однако целенаправленный сравнительный анализ генов диссимиляционного метаболизма серы непосредственно в геномах близкородственных штаммов D-401 и D-402 ранее не проводился. Для последующего анализа опубликованные сборки геномов обоих штаммов были дополнительно скорректированы. Исходные последовательности были получены с использованием платформы PacBio RS II (Fomenkov *et al.*, 2018; Fomenkov *et al.*, 2015), для которой характерна повышенная частота ошибок секвенирования, в том числе в гомополимерных участках (Weirather *et al.*, 2017). Коррекцию геномных последовательностей проводили с использованием чтений Illumina. В результате в геноме D-401 было исправлено 65 участков, а в геноме D-402 — 22. После коррекции число аннотированных псевдогенов в обоих геномах уменьшилось приблизительно в два раза, преимущественно за счет устранения

ошибочно определенных сдвигов рамки считывания. Уточненные последовательности были депонированы в GenBank под номерами CP018889.2 для D-401 и CP012373.2 для D-402.

На основе уточненных последовательностей был проведен сравнительный анализ генов, кодирующих компоненты известных систем диссимиляционного окисления соединений серы, в геномах D-401 и D-402. В обоих геномах был выявлен идентичный набор таких генов (Таблица 3). Среди генов, связанных с окислением сульфида, были выявлены гены *sqrA* и *sqrF*, кодирующие сульфид:хиноноксидоредуктазы типов I и VI соответственно, а также *fccAB*, кодирующие субъединицы флавоцитохром-с-сульфиддегидрогеназы. Окисление тиосульфата было представлено разветвленной Sox-системой *soxAXBYZ*, а окисление сульфита — мембранной сульфит:хиноноксидоредуктазой *SoeABC*, кодируемой генами *soeABC*.

**Таблица 3 — Гены, кодирующие ферменты диссимиляционного метаболизма соединений серы у *B. leptomitiformis* D-401 и D-402**

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

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

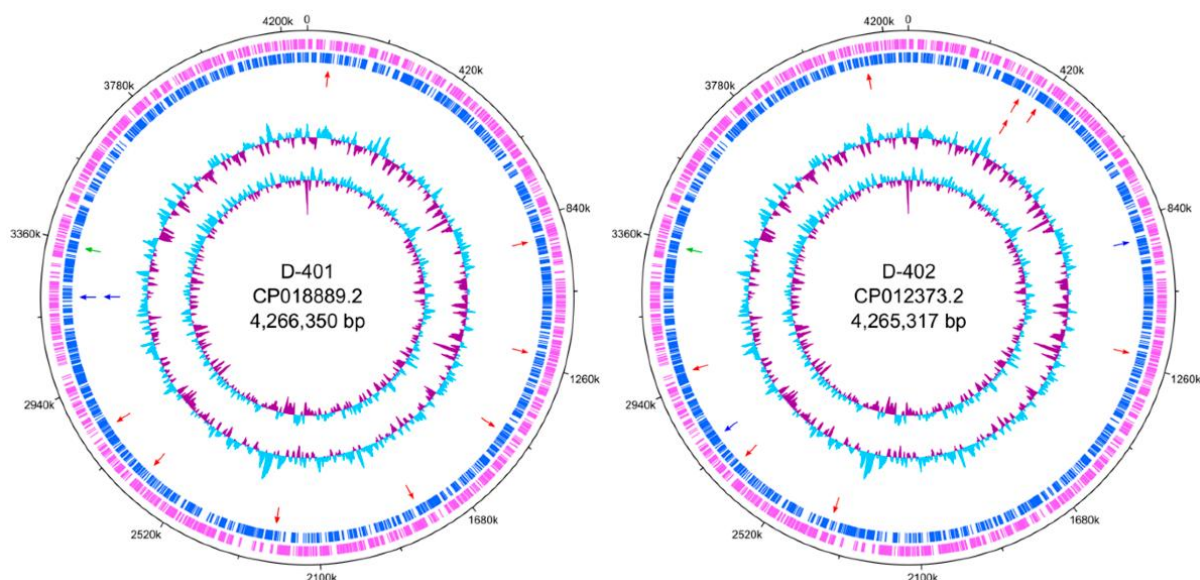
При более детальном сравнительном анализе в геномах обоих штаммов были выявлены гены *dsrEFHC*, тогда как *dsrAB*, кодирующие каталитические субъединицы обратной диссимиляционной сульфитредуктазы rDsrAB, отсутствовали. Таким образом, выявленные Dsr-компоненты не образуют полного rDSR-пути. Гены системы sHdr, кодирующей Hdr-подобный комплекс, а также ген *sor*, кодирующий серооксигеназу/редуктазу SOR, катализирующую кислородзависимое диспропорционирование элементной серы с образованием сульфита и H<sub>2</sub>S, также не были выявлены. Кроме того, в геномах обоих штаммов отсутствовали гены *psrABC*, кодирующие комплекс полисульфидредуктазы PsrABC, участвующий в диссимиляционном восстановлении полисульфидов до сульфида.

Гены *sorAB*, а также гены APS-зависимого пути окисления сульфита *aprAB*, *sat/sopT* и *apt* аденилилсульфат:фосфат-аденилилтрансферазы в обоих геномах отсутствовали.

Таким образом, сравнительный анализ не выявил различий между D-401 и D-402 по составу рассмотренных генов диссимиляционного окисления соединений серы. Сравнение нуклеотидных последовательностей кодирующих областей этих генов и соответствующих промоторных участков также не выявило различий между двумя штаммами. Это позволило предположить, что отсутствие накопления внутриклеточной элементной серы у D-401 и различия между штаммами в использовании восстановленных соединений серы могут быть обусловлены изменениями других генов, связанных с диссимиляционным метаболизмом соединений серы.

### 3.1.2 Сравнение полных геномов штаммов D-401 и D-402

Для выявления генетических различий, которые могли быть связаны с контрастными физиологическими свойствами штаммов *B. leptomitiformis* D-401 и D-402, было проведено полногеномное выравнивание уточненных последовательностей их хромосом. Крупных перестроек в геномах обнаружено не было (Рисунок 7).



**Рисунок 7 — Карта различий между геномами *B. leptomitiformis* D-401 и D-402**

От внешнего кольца к внутреннему: кольца 1 и 2 — предсказанные открытые рамки считывания, 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).

Всего между геномами был выявлен 21 локус различий: 16 длинных вставок, четыре однонуклеотидные вставки и одна однонуклеотидная замена. В каждом геноме присутствовало по восемь длинных вставок, отсутствовавших в соответствующих участках другого генома. В геноме D-401 четыре вставки имели размер 782 п.н. и четыре — 853 п.н.; кроме того, были выявлены две однонуклеотидные вставки (Таблица 4). В геноме D-402 шесть вставок имели размер 853 п.н., одна — 378 п.н. и одна — 11 п.н.; также были выявлены две однонуклеотидные вставки (Таблица 5). Еще одно различие было представлено однонуклеотидной заменой (Рисунок 7).

Локусы выявленных различий не образовывали отдельных кластеров и были распределены по различным участкам геномов.

Для выяснения природы выявленных длинных вставок был проведен кластерный анализ их нуклеотидных последовательностей. В анализ были включены 15 вставок длиной от 378 до 853 п.н.; вставка длиной 11 п.н. в дендрограмму не вошла. Исследованные последовательности были разделены на три типа, внутри каждого из которых уровень нуклеотидной идентичности превышал 97 % (Рисунок 8). К типу 1 были отнесены десять вставок длиной 853 п.н., обнаруженные в обоих геномах, к

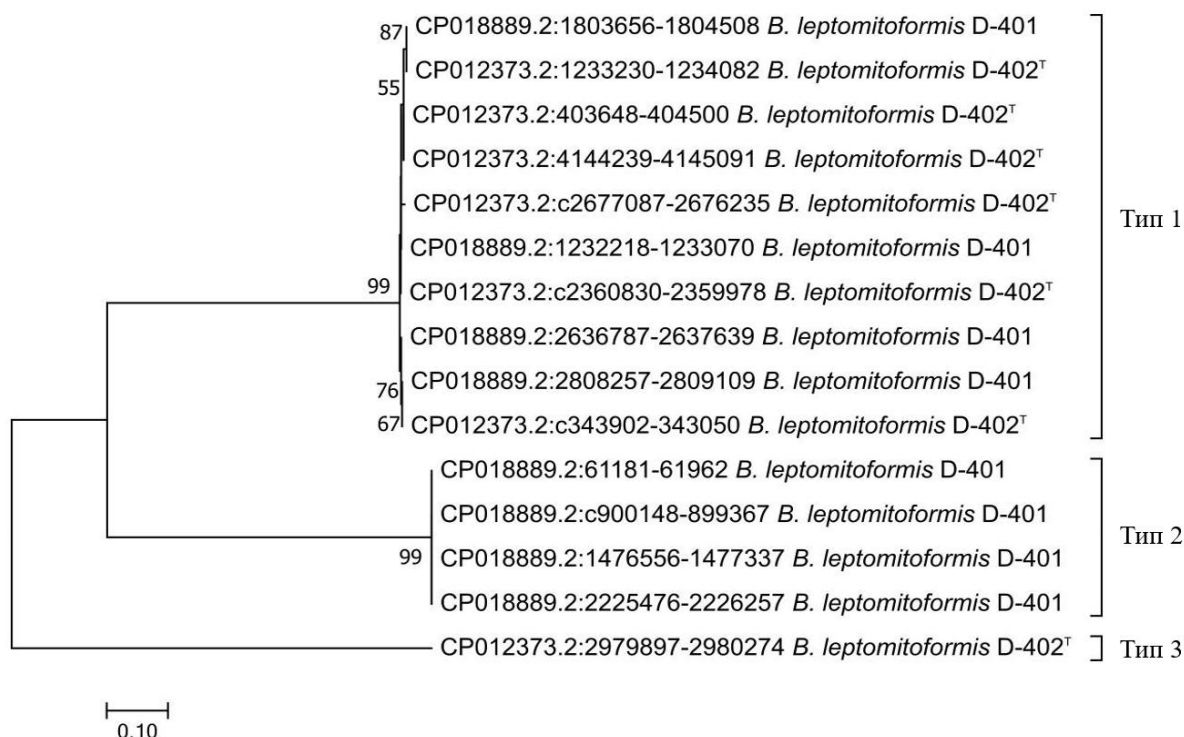
типу 2 — четыре вставки длиной 782 п.н., различавшие геномы и присутствовавшие только у D-401, а к типу 3 — единственная вставка длиной 378 п.н., выявленная у D-402.

**Таблица 4 — Координаты и длина вставок, выявленных в геноме *B. leptomitiformis* 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 5 — Координаты и длина вставок, выявленных в геноме *B. leptomitiformis* 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                 |



**Рисунок 8 — Дендрограмма 15 длинных вставок, выявленных в геномах штаммов *B. leptomitoformis* D-401 и D-402**

Цифрами в узлах указаны значения бутстреп-поддержки (цит. по Rudenko *et al.*, 2020).

На концах вставок типов 1 и 2 были обнаружены инвертированные и прямые повторы, последовательности которых были идентичны внутри каждого типа (Таблица 6). Для вставки типа 3 такие повторы выявлены не были. Наличие характерных концевых повторов у последовательностей типов 1 и 2 указывало на их возможную принадлежность к мобильным генетическим элементам.

**Таблица 6 — Инвертированные и прямые повторы на концах длинных вставок типов 1 и 2 (цит. по Rudenko *et al.*, 2020)**

| Транспозон | Инвертированный повтор | Прямой повтор |
|------------|------------------------|---------------|
| Тип 1      | grgcstgtcatcaaata      | ta            |
| Тип 2      | ggtagtgctaaaga         | ng            |

Поиск по точному совпадению последовательностей инвертированных повторов позволил выявить дополнительные копии элементов типов 1 и 2. В геноме D-402 были обнаружены 34 последовательности типа 1 и 12 последовательностей типа 2, тогда как в геноме D-401 — 32 и 16 последовательностей соответственно. Таким образом, присутствие четырех дифференцирующих вставок типа 2 только у D-401 не означало

отсутствия элементов этого типа в геноме D-402: дополнительные копии соответствующих последовательностей были представлены в обоих геномах.

Среди выявленных копий были обнаружены полноразмерные элементы типов 1 и 2 длиной 1731 и 1660 п.н. соответственно. Последовательности полноразмерных элементов, присутствовавших в геноме D-402, были полностью идентичны соответствующим последовательностям в геноме D-401. Каждый элемент содержал по четыре аннотированные кодирующие области. В элементе типа 1 все четыре области были аннотированы как гены транспозаз, включая транспозазы семейств IS5 и IS630 (Таблица 7). Элемент типа 2 содержал гены транспозаз семейств IS630 и IS1, ген другой транспозазы и ген гипотетического белка (Таблица 8).

**Таблица 7 — Аннотированные кодирующие области полноразмерного транспозона типа 1 в геномах *B. leptomitiformis* D-401 и D-402 (цит. по Rudenko *et al.*, 2020)**

| D-401 Locus tag | Координаты D-401 | D-402 Locus tag | Координаты D-402 | Аннотация                |
|-----------------|------------------|-----------------|------------------|--------------------------|
| BLE401_00700    | 1275730–1276023  | AL038_05285     | 1275884–1276177  | IS5 family transposase   |
| BLE401_00695    | 1276046–1276516  | AL038_05290     | 1276200–1276670  | IS630 family transposase |
| BLE401_00690    | 1276503–1276868  | AL038_05295     | 1276657–1277022  | transposase              |
| BLE401_00685    | 1277024–1277356  | AL038_05300     | 1277178–1277510  | transposase              |

**Таблица 8 — Аннотированные кодирующие области полноразмерного транспозона типа 2 в геномах *B. leptomitiformis* D-401 и D-402 (цит. по Rudenko *et al.*, 2020)**

| D-401 Locus tag | Координаты D-401 | D-402 Locus tag | Координаты D-402 | Аннотация                |
|-----------------|------------------|-----------------|------------------|--------------------------|
| BLE401_08135    | 3785125–3785391  | AL038_16115     | 3783239–3783505  | hypothetical protein     |
| BLE401_08130    | 3785411–3785881  | AL038_16120     | 3783525–3783995  | IS630 family transposase |
| BLE401_08125    | 3785868–3786233  | AL038_16125     | 3783982–3784347  | transposase              |
| BLE401_08120    | 3786281–3786706  | AL038_16130     | 3784395–3784820  | IS1 family transposase   |

Наличие концевых повторов и генов транспозаз подтвердило, что последовательности типов 1 и 2 представляют собой транспозоны. Вставка типа 3 не содержала выявленных концевых повторов и по использованным критериям не была отнесена к транспозонам. Следовательно, основная часть различий между геномами D-401 и D-402 была связана с различным расположением копий мобильных генетических элементов, а не с крупными перестройками хромосом.

### **3.1.3 Выявление генов-кандидатов, нарушенных транспозонными вставками в геноме штамма D-401**

Однонуклеотидная замена была локализована в кодирующей области гена регулятора ответа, однако не приводила к изменению аминокислотной последовательности белка. Четыре однонуклеотидные вставки вызывали сдвиги рамки считывания в генах, кодирующих предполагаемый белок наружной мембраны семейства BamA/TamA, длинноцепочечную ацил-КоА-синтетазу и транспозазу. Исходя из предполагаемых функций этих белков, данные различия не рассматривались в качестве основных кандидатов, способных объяснить отсутствие накопления внутриклеточной элементной серы у D-401.

В геноме D-401 были выявлены три транспозонные вставки, локализованные внутри кодирующих последовательностей генов и потенциально нарушающие их функцию. Интактные гомологи этих генов в геноме D-402 кодировали предполагаемый белок оболочки серных глобул ALG67575.1, предполагаемый порин ALG68134.1 и белок ALG67202.2, содержащий сенсорный домен неизвестной функции.

Наиболее вероятным кандидатом являлся ген, соответствующий белку ALG67575.1. Белки оболочки серных глобул обычно не содержат выраженных консервативных доменов, позволяющих надежно идентифицировать их только на основании анализа аминокислотной последовательности. У *B. alba* B18LD при культивировании в присутствии сульфида вокруг включений элементной серы был обнаружен белок с молекулярной массой около 15 кДа (Schmidt *et al.*, 1986). Последовательность ALG67575.1 была обогащена регулярно расположенными остатками пролина и содержала отщепляемый N-концевой сигнальный пептид, необходимый для транспорта белка в периплазматическое пространство. Эти признаки соответствовали особенностям ранее охарактеризованных белков оболочки серных

глобул (Dahl, 2017). Сходные последовательности были выявлены у *B. alba* B18LD и *T. psekupsensis* D3 (Рисунок 9).

#### ***Beggiatoa leptomitoformis* D-402 (ALG67575.1)**

MLKIAKVLALSTVLGAGFVAAPAHAWWGGPGSGWGNNEWGPFDDGSGWGDFNMSMGGGGRGYGRQYNN  
YNYSGYPGYGGYAPAPAYGAAPYGGYAPAPYAGYGVAAPYAGYGAAPYGGGYAPAPYAGYGVA  
GAVPPASVAPAAPEAK

#### ***Beggiatoa alba* B18LD (EIJ43877.1)**

MLKIAKVLALSAVLGAGVAAAPAQAWWGAPGWGPGSGSGWNDWGPFDGSGWGDFNMSMGGGGRGYGR  
QYSNYGYYPYGGYGGYPYGGYGYPYGGYAPATPYGYAPAAPYGYAPPYGAVPAPPTAPPTAPDA  
K

#### ***Thioflexithrix psekupsensis* D3 (OUD13142.1)**

MKMTAKALAIISTILGAAALAATPAQAWWGWGPGSGWGGPWGGGPGSSAYDIGPFDDGSGWGDFNMSMG  
GGGRGYGSGRNHYQGYGYPVYGYGYPVYGYGYPGYGYGYPAPAYGYPGYGAVPPVPPPPAYGVAPEY  
SAPAAPPEAK

### **Рисунок 9 — Аминокислотные последовательности белков, предположительно являющихся белками оболочки серных глобул**

Н-концевые транспортные пептиды обозначены зеленым цветом; остатки пролина — желтым цветом (цит. по Rudenko *et al.*, 2020).

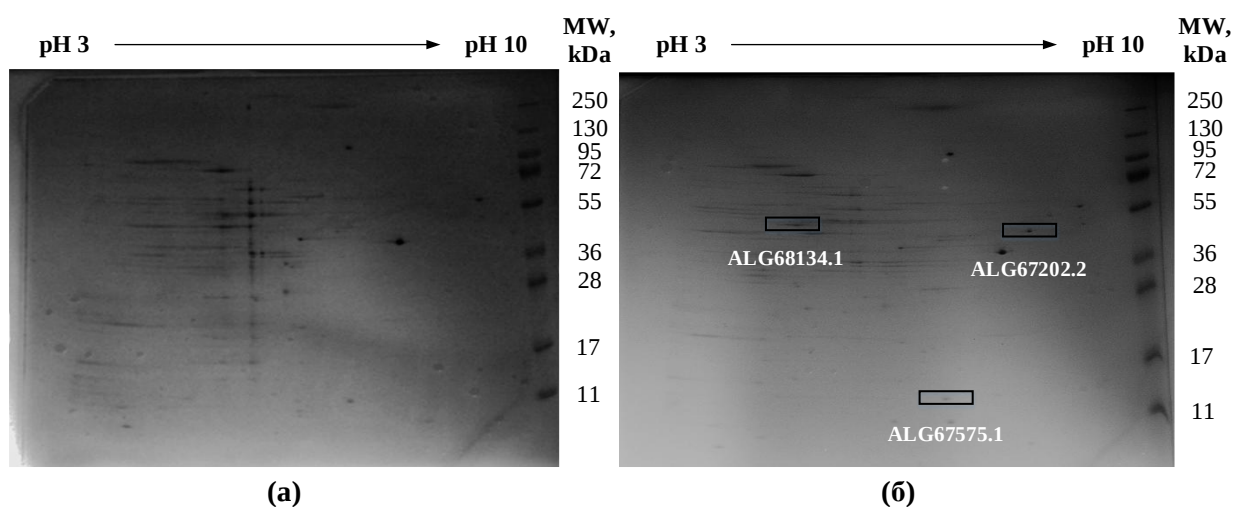
Второй нарушенный у D-401 ген соответствовал белку ALG68134.1, аннотированному как предполагаемый порин. Порины формируют каналы во внешней мембране, обеспечивающие перенос низкомолекулярных соединений. Поэтому ALG68134.1 мог участвовать в транспорте соединений, используемых при литотрофном росте, потенциально включая тиосульфат. Третий ген кодировал белок ALG67202.2, содержащий предполагаемый сенсорный домен неизвестной функции.

#### **3.1.4 Протеомный анализ штаммов *B. leptomitoformis* D-401 и D-402**

Согласно результатам геномного анализа, три транспозона в геноме D-401 были локализованы внутри кодирующих последовательностей трех генов, что могло препятствовать образованию соответствующих полноразмерных белков. Для проверки этого предположения был проведен сравнительный протеомный анализ штаммов D-401 и D-402, культивируемых литогетеротрофно в присутствии лактата и тиосульфата.

### 3.1.4.1 Сравнение протеомных карт штаммов *B. leptomitiformis* D-401 и D-402

Анализ протеомных карт, полученных методом двумерного гель-электрофореза, выявил различия в белковых профилях D-401 и D-402 (Рисунок 10). Для дальнейшего исследования на протеомных картах обоих штаммов были выбраны пятна, расположенные в областях, соответствовавших расчетным молекулярным массам полноразмерных белков-кандидатов и предполагаемых продуктов генов, содержащих транспозонные вставки. Положение пятен на протеомной карте использовалось только для их предварительного отбора, тогда как идентификацию содержащихся в них белков проводили масс-спектрометрически.



**Рисунок 10 — Профили экспрессии белков штаммов *B. leptomitiformis* D-401 (а) и D-402 (б) после двумерного гель-электрофореза на протеомных картах**  
 Культивирование проводили в присутствии тиосульфата и лактата (цит. по Rudenko *et al.*, 2020).

### 3.1.4.2 Идентификация белков-кандидатов методами MALDI-TOF/TOF-MS и ВЭЖХ-МС/МС

Отобранные белковые пятна были исследованы MALDI-TOF/TOF-MS. В пятнах из протеомной карты D-402 были идентифицированы пептиды предполагаемого белка оболочки серных глобул ALG67575.1 и предполагаемого порина ALG68134.1 (Таблица 9). В соответствующих областях протеомной карты D-401 также присутствовали белковые пятна, однако при их масс-спектрометрическом анализе были идентифицированы другие белки; пептиды ALG67575.1 и ALG68134.1 обнаружены не были. Белок ALG67202.2 не был идентифицирован ни в одном из исследованных образцов.

**Таблица 9 — Результаты идентификации белков *B. leptomitiformis* методом MALDI-масс-спектрометрии (цит. по Rudenko *et al.*, 2020)**

| Белок      | Расчетная молекулярная масса, кДа | Пептиды, идентифицированные в белковом пятне методом MS/MS |
|------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------|
| ALG67575.1 | 15,071                            | GGPGSGWGNNEWGPFDGSGWG<br>DFNMSMGGGGR                       |
|            |                                   | PAPYAGYGVAPYGAVPPASVPA                                     |
| ALG68134.1 | 47,384                            | NFDGLDRDD                                                  |
|            |                                   | GDKYSSYGFLVQA                                              |

Дополнительно протеомы обоих штаммов были исследованы методом ВЭЖХ-МС/МС. Среди белков D-402 были обнаружены предполагаемый порин ALG68134.1 с идентификатором TrEMBL UPI0007069FE2 и предполагаемый белок оболочки серных глобул ALG67575.1 с идентификатором TrEMBL UPI00070625ED. В протеоме D-401 эти белки выявлены не были.

На Рисунке 11 представлены последовательности ALG68134.1 и ALG67575.1 с отмеченными пептидами, идентифицированными методами MALDI-TOF/TOF-MS и ВЭЖХ-МС/МС. Для ALG68134.1 пептиды, выявленные методом ВЭЖХ-МС/МС, полностью включали последовательности пептидов, обнаруженных методом MALDI-TOF/TOF-MS. Покрытие аминокислотной последовательности ALG68134.1 составляло 71,6 %. Для ALG67575.1 пептид N-концевой области был идентифицирован только методом MALDI-TOF/TOF-MS, тогда как пептиды C-концевой области были выявлены обоими масс-спектрометрическими методами. Общее покрытие последовательности ALG67575.1 составляло 40,4 %.

Таким образом, методами MALDI-TOF/TOF-MS и ВЭЖХ-МС/МС было подтверждено образование полноразмерных белков ALG67575.1 и ALG68134.1 у D-402. В протеоме D-401 соответствующие белки при исследованных условиях культивирования выявлены не были, что согласовалось с нарушением кодирующих последовательностей этих генов транспозонными вставками. Белок ALG67202.2 не был обнаружен ни у одного из штаммов, поэтому влияние соответствующей вставки на образование его белкового продукта установить не удалось.

**А.**

MSFSKHLQVGCASALVALAPFAMADDAADMKRQLQQQLQQRLDLTLESNPGMSLGAKPKFSLQLSG  
QVNRAVMYGDDGTDSDTFFVDGTDASRVEILGKHSLSDDVTLGTNIEVEYLSNNSSEVDINQT  
 KSVDHNGFSERTLEFYAESATLGRLSLGQGSMASNDTAEYDLNSSLAGMYSFGADFGANLSFR  
 DADTKAKIATIGQVHSNFDGLDRDDRIRYDTPSFGGLTLSVAASTAEKWDAGITFQRTFGPIDL  
 ALGLGYGNVGDSEAYLYEDDEGNTYQLYKHVYSASFSILHTPSGLSMTLAGGGLSNDLSLTITIK  
DLPSNVSDTLGDNREDTDPFWSAKLGYAIDATSIGKTSFGLSYNRTEDYRTCLGYDSVNNTDV  
FLSCGDKYSSYGFLVQAIDKASTEIYFGARNHQLESAGLNPDDILTIYSGARVKF

**Б.**

MLKIAKVLALSTVLGAGFVAAPAHAWWGPGSGWGNNEWGPFDGSGWGDFNMSMGGGGRGYGRQ  
 YNNYNSGYPGYYGGYAPAPAYGAAPYGGYAPAPYAGYGVAPAPYAGYGAAPYGGGYAPAPYAG  
 YGVAPYGAVPPASVPAPAAPEAK

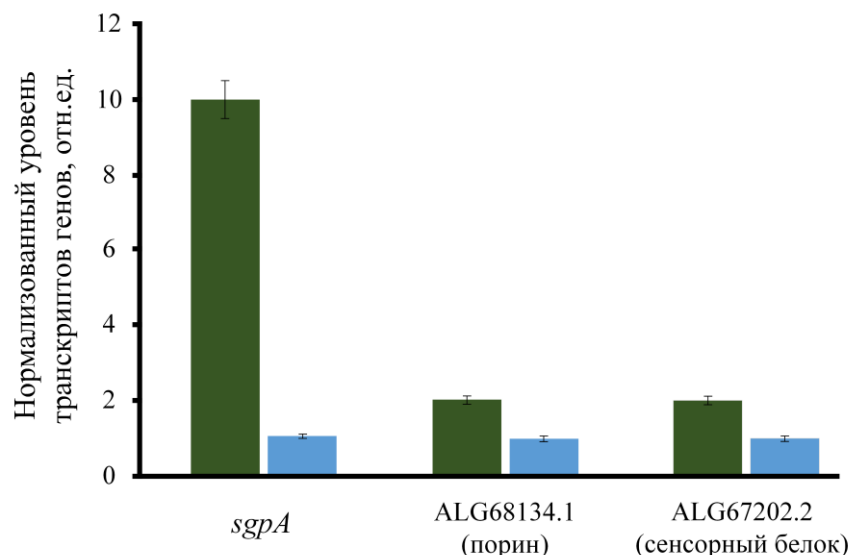
**Рисунок 11 — Покрытие последовательности белка ALG68134.1 (А) и  
 ALG67575.1 (Б) идентифицированными пептидами**

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).

### 3.1.5 Влияние тиосульфата на экспрессию генов-кандидатов у штамма D-402

Для оценки возможного участия белков ALG67575.1, ALG68134.1 и ALG67202.2 в метаболизме восстановленных соединений серы была исследована экспрессия кодирующих их генов у *B. leptomitiformis* D-402. Штамм выращивали хемолитогетеротрофно в присутствии лактата и тиосульфата и хемоорганогетеротрофно в присутствии лактата без добавления тиосульфата.

Добавление тиосульфата не оказывало выраженного влияния на экспрессию генов, кодирующих предполагаемый порин ALG68134.1 и белок с сенсорным доменом неизвестной функции ALG67202.2. В то же время экспрессия гена, кодирующего предполагаемый белок оболочки серных глобул ALG67575.1, при хемолитогетеротрофном росте была в 10 раз выше, чем при хемоорганогетеротрофном росте (Рисунок 12).



**Рисунок 12 — Экспрессия генов, кодирующих белки ALG67575.1 (предполагаемый SgpA), ALG68134.1 и ALG67202.2 штамма *B. leptomitiformis* D-402 при хемолитогетеротрофном (а) и хемоорганогетеротрофном (б) росте**

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

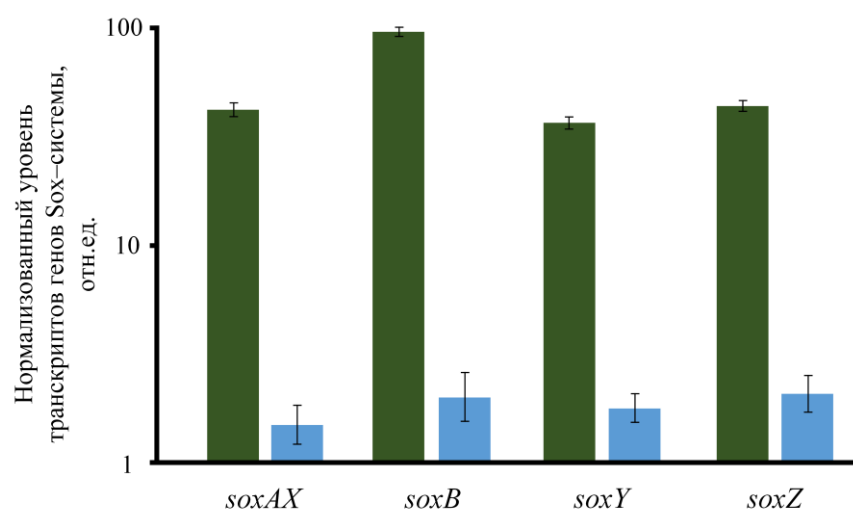
Таким образом, из трех исследованных генов выраженная зависимость экспрессии от присутствия тиосульфата была установлена только для гена, кодирующего предполагаемый белок оболочки серных глобул ALG67575.1. Повышение его экспрессии при хемолитогетеротрофном росте согласовалось с обнаружением полноразмерного белка ALG67575.1 в протеоме D-402, выращенного в присутствии лактата и тиосульфата.

### 3.1.6 Сравнительный анализ экспрессии генов Sox-системы у штаммов D-401 и D-402

Дополнительно была исследована экспрессия генов *soxA*X, *soxB*, *soxY* и *soxZ*, кодирующих компоненты разветвленной Sox-системы окисления тиосульфата. Выбор этих генов был обусловлен участием Sox-системы в диссимиляционном окислении тиосульфата, которое у D-402 сопровождается накоплением внутриклеточной элементной серы, тогда как у D-401 ее накопления не наблюдается (Dubinina *et al.*, 2017). Анализ проводили у штаммов D-401 и D-402, выращенных хемолитогетеротрофно в присутствии лактата и тиосульфата.

Экспрессия генов *soxA*X, *soxB*, *soxY* и *soxZ* была выявлена у обоих штаммов. Однако экспрессия всех исследованных генов у D-401 была на порядок ниже, чем

у D-402 (Рисунок 13). У D-402 экспрессия гена *soxB* при хемолитогетеротрофном росте была в 2,4 раза выше, чем экспрессия остальных исследованных генов Sox-системы. Гены *soxA*, *soxY* и *soxZ* экспрессировались приблизительно одинаково. Ген *soxB* кодирует сульфат-тиогидролазу SoxB, которая гидролитически отщепляет сульфатную группу от связанного с SoxYZ промежуточного соединения на начальной стадии разветвленного Sox-зависимого пути окисления тиосульфата. Более высокая экспрессия *soxB* могла отражать повышенную потребность в SoxB при активном окислении тиосульфата у D-402, однако проведенный анализ не позволил установить причины выявленного различия.



**Рисунок 13 — Экспрессия генов Sox-системы у *B. leptomitiformis* 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. У штамма D-402 белок ALG67575.1 выявлялся, а экспрессия кодирующего его гена возрастала в присутствии тиосульфата. Функциональная значимость белков оболочки серных глобул показана для *Allochromatium vinosum*: двойной мутант по генам *sgpB* и *sgpC* утрачивал способность формировать серные глобулы и использовать  $H_2S$  в качестве донора электронов (Prange *et al.*, 2004).

Полученные результаты согласуются с участием ALG67575.1 в образовании или стабилизации внутриклеточных включений элементной серы у штамма D-402. Белковая оболочка серных включений рассматривается как структура, обеспечивающая депонирование значительных количеств  $S^0$  и ограничивающая ее непосредственный контакт с компонентами клетки; такой контакт потенциально может оказывать токсическое действие (Rudenko *et al.*, 2020). Поэтому нарушение образования белковой оболочки у D-401 могло косвенно влиять на метаболизм восстановленных соединений серы и экспрессию генов Sox-системы. Однако накопление свободной  $S^0$  у D-401, ингибирование ею ферментативных реакций и непосредственная причинная связь этого процесса со снижением экспрессии sox-генов экспериментально не установлены. Предполагаемый механизм следует рассматривать как рабочую гипотезу.

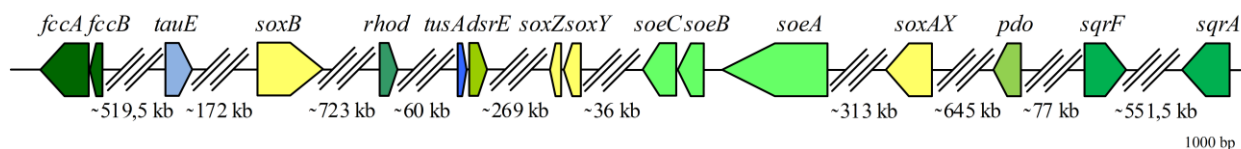
## 3.2 Выяснение путей превращения элементной серы у *B. leptomitiformis* D-402

### 3.2.1 Поиск и филогенетический анализ предполагаемой персульфиддиоксигеназы

Представители рода *Beggiatoa* получают энергию за счет окисления восстановленных соединений серы. Продуктами этих реакций являются элементная сера, накапливающаяся внутри клеток, и сульфат (Dubinina *et al.*, 2017; Rudenko *et al.*, 2020; Schmidt *et al.*, 1987; Prange *et al.*, 2002). Наблюдения за ростом *B. leptomitiformis* D-402 в присутствии восстановленных соединений серы показали, что внутриклеточные включения элементной серы сначала исчезают, а затем образуются повторно. У других сероокисляющих прокариот окисление запасенной элементной серы осуществляется с участием обратной диссимиляционной сульфитредуктазы rDsr или сероокисляющего Hdr-подобного комплекса sHdr. Однако гены rDSR- и sHdr-систем окисления элементной серы, а также ген *sor* в геноме *B. leptomitiformis* отсутствуют. Не обнаружены также гены *psrABC* полисульфидредуктазы, обеспечивающей диссимиляционное восстановление полисульфидов до сульфида. Поэтому механизм исчезновения внутриклеточных серных включений у представителей рода *Beggiatoa* оставался неясным.

Ранее проведенный биоинформатический анализ геномов штаммов *B. leptomitiformis* показал, что в превращении соединений серы у этих бактерий могут участвовать ферменты и ферментные комплексы, локализованные в различных

компартаментах клетки (Dubinina *et al.*, 2017; Rudenko *et al.*, 2020). Дополнительный анализ геномов выявил гены белка семейства TauE/SafE, предположительно участвующего в экспорте сульфита, роданазы Rhd, переносчика серы TusA и DsrE-подобного белка. Гены, связанные с диссимиляционным метаболизмом соединений серы, не образовывали единого кластера и были распределены по различным участкам генома (Рисунок 14).



**Рисунок 14 — Организация генов, кодирующих ферменты диссимиляционного окисления сульфида, в геноме *B. leptomitiformis***

*fccA* — ген цитохром-с-субъединицы флавоцитохром-с-сульфиддегидрогеназы (КФ 1.8.2.3; AUI67863.1); *fccB* — ген флавопротеиновой субъединицы флавоцитохром-с-сульфиддегидрогеназы (КФ 1.8.2.3; AUI67862.2); *tauE* — ген белка семейства TauE/SafE, предположительно участвующего в экспорте сульфита (AUI67490.1); *soxB* — ген тиосульфогидролазы SoxB (КФ 3.1.6.20; AUI67367.1); *rhd* — ген роданазы, или сератрансферазы (КФ 2.8.1.1; AUI70268.1); *tusA* — ген белка-переносчика серы TusA (AUI70013.1); *dsrE* — ген белка семейства DsrE/DsrF/DsrH (AUI70012.1); *soxZ* — ген белка SoxZ комплекса-переносчика серы при окислении тиосульфата (КФ 1.8.2.6; AUI69817.1); *soxY* — ген белка-переносчика серы SoxY (КФ 1.8.2.6; AUI69816.1); *soeABC* — гены мембраносвязанной цитоплазматической сульфит:хинооксидоредуктазы SoeABC (КФ 1.8.5.6; AUI70655.1, AUI69788.1 и AUI69789.1); *soxAX* — ген цитохром-с-содержащего белка SoxAX (КФ 1.8.2.3; AUI69545.1); *pdo* — ген персульфиддиоксигеназы (КФ 1.13.11.18; ALG68607.1); *sqrF* — ген сульфид:хинооксидоредуктазы типа VI SqrF (КФ 1.8.5.4; AUI68992.1); *sqrA* — ген сульфид:хинооксидоредуктазы типа I SqrA (КФ 1.8.5.4; AUI68548.1) (цит. по Rudenko *et al.*, 2024).

Для поиска других ферментов, потенциально участвующих в превращении внутриклеточной элементной серы у представителей рода *Beggiatoa*, был проведен анализ BLASTP с использованием аминокислотных последовательностей известных персульфиддиоксигеназ. У ряда прокариот персульфиддиоксигеназы участвуют в окислении сульфановой серы, связанной с низкомолекулярными персульфидами (Liu *et al.*, 2014; Sattler *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2017; Motl *et al.*, 2017). Внутриклеточные серные включения представителей рода *Beggiatoa* содержат циклооктасеру S<sub>8</sub> и неорганические полисульфиды. Полисульфиды рассматриваются как биодоступная форма запасенной серы, тогда как циклооктасера должна быть предварительно активирована (Berg *et al.*, 2014). Для представителей родов *Acidithiobacillus* и *Acidiphilium* показано, что глутатион неферментативно

взаимодействует с элементной серой с образованием персульфида глутатиона GSSH, являющегося субстратом персульфиддиоксигеназы (Rohwerder, Sand, 2003).

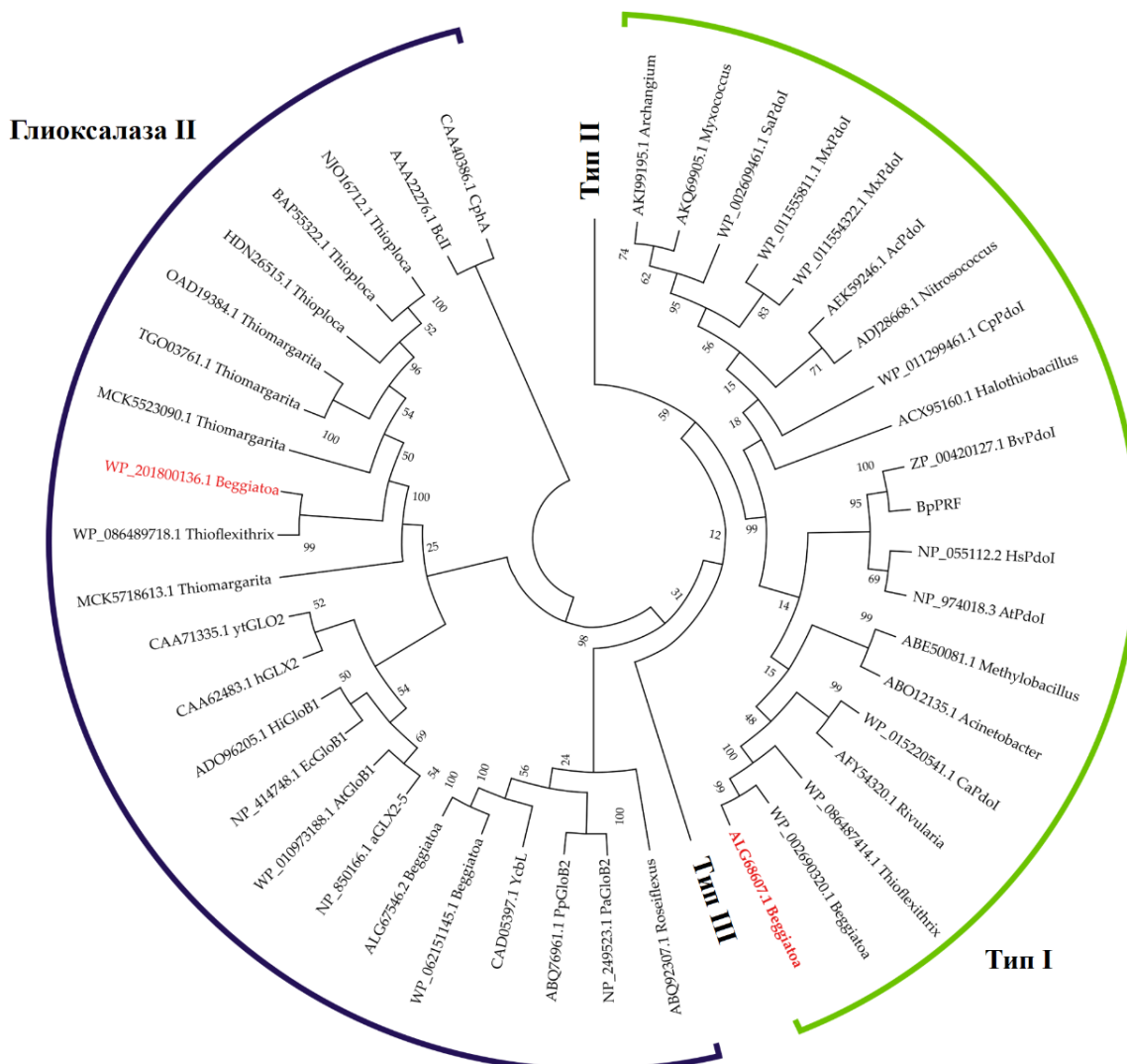
В результате у штамма D-402 были выявлены два белка — ALG68607.1 и WP\_201800136.1, уровень идентичности аминокислотных последовательностей которых с известными персульфиддиоксигеназами составлял около 30 %.

Для уточнения предполагаемых функций обнаруженных белков был проведен филогенетический анализ, включавший функционально охарактеризованные персульфиддиоксигеназы разных типов и родственные белки семейства металло- $\beta$ -лактамаз (Liu *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2017). Последовательность ALG68607.1 группировалась с персульфиддиоксигеназами типа I, тогда как WP\_201800136.1 входила в кластер глиоксалаз II (Рисунок 15). На основании полученного результата ALG68607.1 была выбрана в качестве предполагаемой персульфиддиоксигеназы у штамма *B. leptomitiformis* D-402 для последующего экспериментального исследования.

Анализ последовательности ALG68607.1 с использованием SignalP 5.0 не выявил сигнального пептида или трансмембранных участков. Программа PSORTb v3.0 также предсказала цитоплазматическую локализацию этого белка, соответствующую локализации большинства охарактеризованных бактериальных персульфиддиоксигеназ.

В геноме D-402 были выявлены гены, кодирующие роданазу Rhd, переносчик серы TusA и DsrE-подобный белок. У *Allochromatium vinosum* эти белки участвуют в цитоплазматическом переносе сульфановой серы к компонентам rDsr-системы, а у других сероокисляющих бактерий родственные сератрансферазы обеспечивают ее передачу комплексу sHdr-LbpA (Stockdreher *et al.*, 2012; Stockdreher *et al.*, 2014; Tanabe *et al.*, 2024). Поскольку у *B. leptomitiformis* гены rDsr- и sHdr-зависимых путей отсутствуют, направление переноса серы и ее конечный акцептор у этого организма остаются неизвестными. Роданазы в других бактериальных системах могут способствовать взаимодействию полисульфидов с глутатионом и влиять на активность персульфиддиоксигеназы (Motl *et al.*, 2017; Ran *et al.*, 2022). Поэтому участие Rhd, TusA и DsrE-подобного белка в мобилизации внутриклеточной сульфановой серы у D-402 представляется возможным, однако их роль в образовании GSSH и передаче

этого соединения персульфиддиоксигеназе требует экспериментального подтверждения.



**Рисунок 15 — 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- $\beta$ -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. leptomitiformis* 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).

### 3.2.2 Протеомный анализ штамма D-402 при использовании внутриклеточной элементной серы

Для проверки предполагаемого участия персульфиддиоксигеназы в превращении внутриклеточной элементной серы был проведен протеомный анализ штамма *B. leptomitiformis* D-402 методом ВЭЖХ-МС/МС. В экспериментальном варианте клетки культивировали на обедненной минеральной среде, не содержащей внешних источников восстановленных соединений серы. В этих условиях запасенная внутри клеток элементная сера служила потенциальным донором электронов, а  $\text{NaHCO}_3$  — источником углерода. Образцы отбирали на седьмые сутки культивирования, когда по данным ОТ-ПЦР в реальном времени наблюдалась максимальная экспрессия гена *pdo* (см. подраздел «Количественный анализ экспрессии генов *pdo* и *soxAXBYZ*»). В качестве контроля использовали культуры, выращенные хемолитогетеротрофно в присутствии тиосульфата и лактата и хемоорганогетеротрофно в присутствии лактата.

В экспериментальных и контрольных образцах было надежно идентифицировано 1989 белков. Белок считали идентифицированным при обнаружении не менее двух пептидов, аминокислотные последовательности которых были установлены по тандемным масс-спектрам. Отдельно была проанализирована представленность основных белков, предположительно участвующих в превращении сероводорода до сульфата у D-402.

Персульфиддиоксигеназа ALG68607.1, соответствующая последовательности UPI000706C17D, была обнаружена только в клетках, культивируемых на минеральной среде без внешних источников восстановленных соединений серы и содержащих внутриклеточную элементную серу. В контрольных образцах, полученных при хемолитогетеротрофном и хемоорганогетеротрофном росте, этот белок выявлен не был. Для тиосульфогидролазы SoxB (UPI0007061722), DsrE-подобного белка (UPI00070692D2) и переносчика серы TusA (UPI0007063E4B) также были установлены статистически значимые изменения представленности при использовании внутриклеточной элементной серы.

Для сульфид:хиноноксидоредуктаз типов I и VI, флавоцитохром-с-сульфиддегидрогеназы, белков SoxAXYZ и транспортера семейства TauE/SafE статистически значимых различий между экспериментальным и контрольными

вариантами выявлено не было. Белки комплекса SoeABC не были идентифицированы ни в одном из исследованных образцов. Ранее было показано, что SoeABC у *B. leptomitiformis* функционирует в микроаэробных условиях, тогда как протеомный анализ проводили при аэробном культивировании (Rudenko *et al.*, 2020). Поэтому отсутствие белков этого комплекса согласовалось с условиями эксперимента и не подтверждало его участие в окислении сульфита, образующегося в результате реакции PDO.

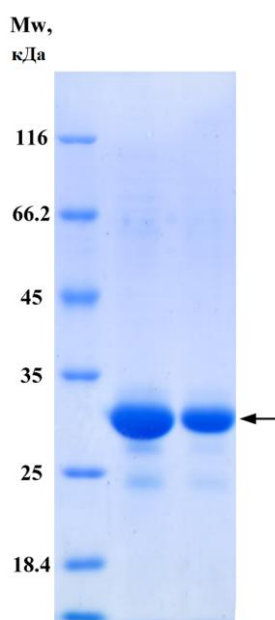
Белки SoxAXYZ обнаруживались как в экспериментальном, так и в контрольных образцах, однако их представленность существенно не различалась. Это могло указывать на их конститутивное образование у D-402. Такая особенность могла быть связана с условиями естественных местообитаний представителей рода *Beggiatoa*, в которых регулярно присутствуют сероводород и тиосульфат, используемые этими бактериями в энергетическом метаболизме (Diao *et al.*, 2018; Arce-Rodríguez *et al.*, 2019; Dahl, 2020).

Отсутствие различий в представленности SQR и FCSD могло быть обусловлено функциями этих ферментов. SQR и FCSD катализируют окисление сероводорода, сопровождающееся образованием внутриклеточной элементной серы, тогда как в исследованных условиях сероводород в среду не добавляли. Следовательно, отсутствие их субстрата могло объяснять сходную представленность этих белков в экспериментальном и контрольных образцах.

### **3.2.3 Клонирование гена *pdo*, получение рекомбинантной персульфиддиоксигеназы и характеристика ее физико-химических свойств**

Для подтверждения функциональной принадлежности белка ALG68607.1 к персульфиддиоксигеназам ген *pdo* штамма *B. leptomitiformis* D-402 был клонирован в плазмиду pET-22b(+). В аминокислотной последовательности белка были выявлены три консервативных остатка железосвязывающего центра — His57, His113 и Asp134 — и три консервативных остатка предполагаемого субстрат-связывающего кармана — Asp61, Tyr177 и Arg194. Эти остатки присутствуют и в персульфиддиоксигеназах типа I человека (hETHE1, идентификатор PDB 4CHL), *Arabidopsis thaliana* (идентификатор PDB 2GCU), *Mycobacterium xanthus* (MxPDO, идентификатор PDB 4YSB), а также в гибридном белке PDO-роданаза *Paraburkholderia phytofirmans* (BpPRF, идентификатор PDB 5VE5) (Sattler *et al.*, 2015; Pettinati *et al.*, 2015; McCoy *et al.*, 2006; Motl *et al.*, 2017).

Конструкцию pET22b::*pdoI* использовали для трансформации компетентных клеток *Escherichia coli* BL21-CodonPlus. Клетки, содержащие рекомбинантный вектор, продуцировали около 12 мг PDO на 1 л культуры. Персульфиддиоксигеназа была получена в форме зрелого фермента с N-концевой 6×His-меткой и очищена в одну стадию методом аффинной хроматографии. Рассчитанная на основании аминокислотной последовательности молекулярная масса белка составляла 28,6 кДа. После денатурации  $\beta$ -меркаптоэтанолом и додецилсульфатом натрия белок мигрировал при электрофорезе в полиакриламидном геле в виде полосы с молекулярной массой около 29 кДа, что соответствовало расчетному значению (Рисунок 16).



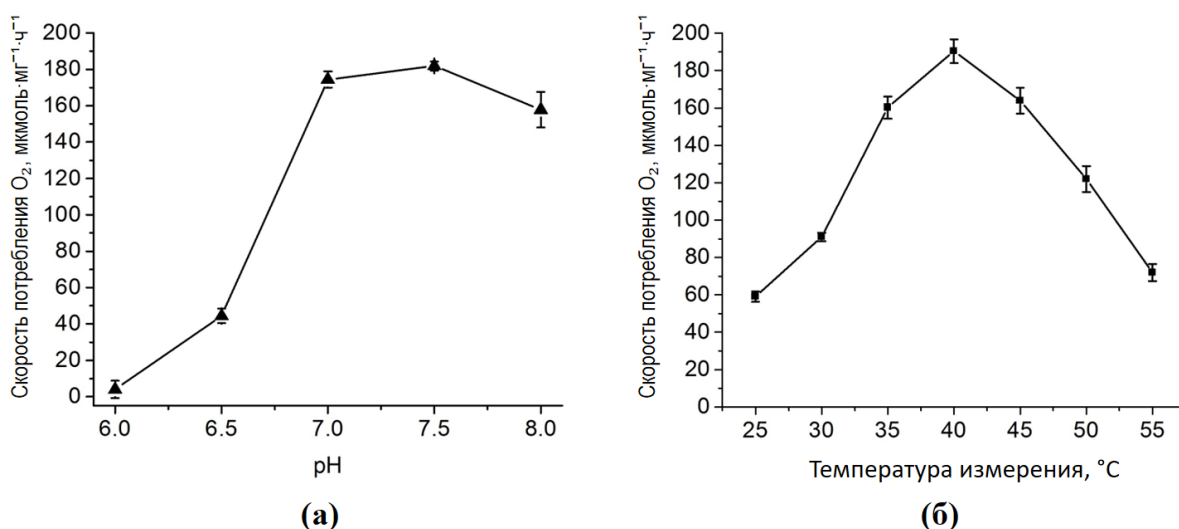
**Рисунок 16 — Электрофорез рекомбинантной персульфиддиоксигеназы *B. leptomitiformis* в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия**

Концентрация акриламида в концентрирующем геле составляла 5 %, в разделяющем геле — 12 %. Окрашивание проводили Кумасси бриллиантовым синим R-250. Mw — маркер молекулярной массы, кДа (Thermo Fisher Scientific, США). Стрелкой обозначена полоса целевого белка PDO (цит. по Rudenko *et al.*, 2024).

Сульфид может окисляться с образованием сульфановой серы, которая при взаимодействии с глутатионом образует персульфид глутатиона GSSH — канонический субстрат персульфиддиоксигеназ (Rohwerder, Sand, 2003; Jackson *et al.*, 2012). Способность полученного рекомбинантного белка окислять GSSH оценивали по скорости поглощения кислорода. В 50 мМ калий-фосфатном буфере при pH 7,0 и

температуре 35 °С скорость поглощения кислорода составляла около 174 мкмоль  $O_2 \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ , что соответствовало удельной активности около 2900  $U \cdot \text{мг}^{-1}$  (Рисунок 17а).

Оптимальная активность рекомбинантной PDO наблюдалась при pH 7,0–7,5, с максимумом около pH 7,5. Снижение pH ниже 7,0 сильнее подавляло активность фермента, чем его повышение выше 7,8. При pH 6,5 активность уменьшалась приблизительно на 75 % относительно максимальной, тогда как при pH 8,0 — только на 10–13 % (Рисунок 17а). Оптимальная температура составляла 40 °С: при этой температуре скорость поглощения кислорода достигала около 190 мкмоль  $O_2 \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ , что соответствовало удельной активности около 3167  $U \cdot \text{мг}^{-1}$  (Рисунок 17б).



**Рисунок 17 — Влияние pH (а) и температуры (б) на активность рекомбинантной PDO *B. leptomitiformis* в присутствии GSSH**

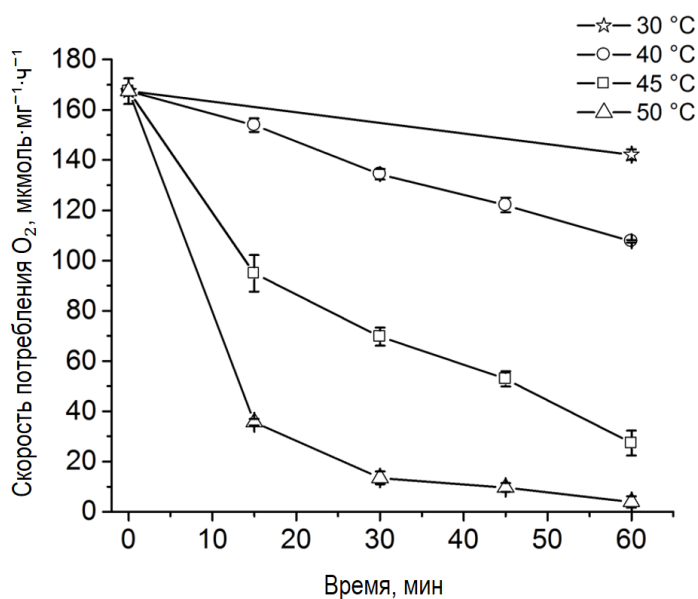
Планками погрешностей показаны стандартные отклонения, рассчитанные по результатам трех измерений (цит. по Rudenko *et al.*, 2024).

Для оценки термостабильности PDO фермент инкубировали в 50 мМ калий-фосфатном буфере при температурах от 30 до 50 °С. После одного часа инкубации при 30 °С сохранялось 84 % исходной активности. При 40, 45 и 50 °С активность наиболее существенно снижалась в течение первых 15 мин, а через один час составляла соответственно 64, 16 и 2 % исходного значения (Рисунок 18).

Стабильность PDO при различных значениях pH оценивали после инкубации фермента в буферах с pH от 6,0 до 11,0 и последующего измерения остаточной активности в 50 мМ калий-фосфатном буфере при pH 7,0 и температуре 35 °С (Рисунок 19). В начале эксперимента PDO сохраняла высокую активность после инкубации в диапазоне pH 6,0–10,0, тогда как при pH 11,0 она снижалась

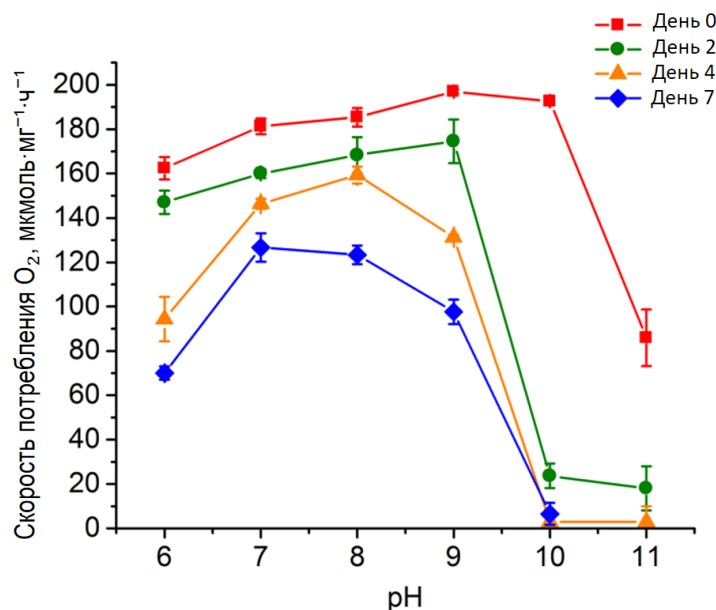
приблизительно на 55 %. На вторые сутки наблюдалось выраженное снижение активности при pH 10,0. При pH 10,0 и 11,0 она составляла не более 10–13 % активности, зарегистрированной при pH 9,0, тогда как при остальных значениях pH снижение относительно начала эксперимента не превышало 10–12 %. На четвертые сутки активность фермента при pH 6,0 заметно уменьшалась и была приблизительно на 55 % ниже, чем при pH 7,0. На седьмые сутки наибольшая остаточная активность сохранялась при pH 7,0 и 8,0, хотя и снижалась на 30–33 % относительно начала эксперимента. При pH 6,0 и 9,0 снижение активности составляло около 57 и 51 % соответственно, а при pH 10,0–11,0 активность полностью утрачивалась.

Влияние ионов металлов и ЭДТА на активность рекомбинантной PDO исследовали при концентрации каждого соединения 1 мМ (Таблица 10). Ионы  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$  существенно подавляли активность фермента. Ионы  $\text{Mg}^{2+}$  практически не влияли на активность, а в присутствии  $\text{Mn}^{2+}$  сохранялось около 83 % исходной активности. Добавление ЭДТА также не приводило к ее существенному изменению: при концентрации ЭДТА 1 мМ сохранялось 92,5 % активности PDO.



**Рисунок 18 — Стабильность рекомбинантной PDO *B. leptomitiformis* при различных температурах в присутствии GSSH**

Остаточную активность определяли в 50 мМ калий-фосфатном буфере при pH 7,0 и температуре 35 °C. Планками погрешностей показаны стандартные отклонения, рассчитанные по результатам трех измерений (цит. по Rudenko *et al.*, 2024).



**Рисунок 19 — Стабильность рекомбинантной PDO *B. leptomitiformis* при различных значениях pH в присутствии GSSH**

Остаточную активность определяли в 50 мМ калий-фосфатном буфере при pH 7,0 и температуре 35 °С. Планками погрешностей показаны стандартные отклонения, рассчитанные по результатам трех измерений (цит. по Rudenko *et al.*, 2024).

**Таблица 10 — Влияние ионов металлов и ЭДТА на активность рекомбинантной PDO *B. leptomitiformis* (цит. по Rudenko *et al.*, 2024)**

|                  | Активность, % | SD  |
|------------------|---------------|-----|
| Контроль         | 100,0         | 2,9 |
| Cu <sup>2+</sup> | 23,7          | 1,5 |
| Zn <sup>2+</sup> | 11,2          | 3,2 |
| Mn <sup>2+</sup> | 83,3          | 4,8 |
| Mg <sup>2+</sup> | 99,6          | 3,7 |
| Fe <sup>3+</sup> | 47,2          | 1,4 |
| Co <sup>2+</sup> | 47,4          | 6,7 |
| Ni <sup>2+</sup> | 20,5          | 6,4 |
| EDTA             | 92,5          | 2,3 |

SD — стандартное отклонение.

Физико-химические свойства PDO *B. leptomitiformis* в целом соответствовали характеристикам ранее исследованных ферментов этого семейства. Для других персульфиддиоксигеназ максимальная активность обычно наблюдалась при физиологических для цитоплазмы значениях pH 7,4–7,8, а температурный оптимум находился в диапазоне 35–45 °С (Wu *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2014; Rühl *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2014). Сравнительно низкая термостабильность полученного фермента могла

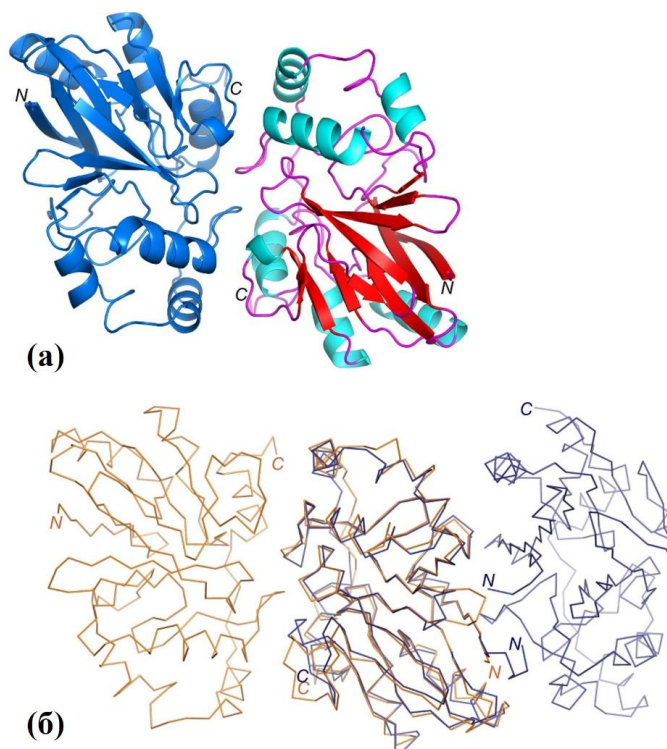
быть связана с тем, что штамм D-402 является мезофилом и растет при температурах от 8 до 32 °C.

Ингибирующее действие  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$  также было установлено ранее для других персульфиддиоксигеназ (Wu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2014). Предполагается, что подавление активности этими ионами может быть связано с замещением железа в активном центре фермента.

### 3.2.4 Структура персульфиддиоксигеназы *B. leptomitiformis*

Структура PDO *B. leptomitiformis* имела димерную организацию и содержала металл-связывающую укладку типа  $\alpha\beta\beta\alpha$  с двумя центральными смешанными  $\beta$ -слоями, каждый из которых состоял из шести  $\beta$ -тяжей и был окружен с обеих сторон  $\alpha$ -спиралями (Рисунок 20а). В структуре PDO *B. leptomitiformis* не визуализировались 14 аминокислотных остатков С-концевого участка, что указывало на подвижность этой области. В асимметричной единице находился один димер PDO *B. leptomitiformis*.

PDO *B. leptomitiformis* характеризовалась высоким общим сходством с известными структурами персульфиддиоксигеназ типа I: человека (hETHE1, идентификатор PDB 4CHL; среднеквадратичное отклонение (RMSD; англ. root-mean-square deviation) 1,10 Å), PDO *Arabidopsis thaliana* (идентификатор PDB 2GCU; RMSD 1,07 Å), PDO *Mucococcus xanthus* (MxPDO, идентификатор PDB 4YSB; RMSD 0,97 Å) и химерного белка PDO-роданаза *Paraburkholderia phytofirmans* (BpPRF, идентификатор PDB 5VE5; RMSD 1,05 Å) (Sattler *et al.*, 2015; Pettinati *et al.*, 2015; McCoy *et al.*, 2006; Motl *et al.*, 2017). Несмотря на сходство структур PDO, между ними были выявлены некоторые различия.



**Рисунок 20 — Общий вид кристаллической структуры PDO *B. leptomitiformis* (PDB 8ZBD) и суперпозиция структур PDO *B. leptomitiformis* и hETHE1 (PDB 4CHL)**

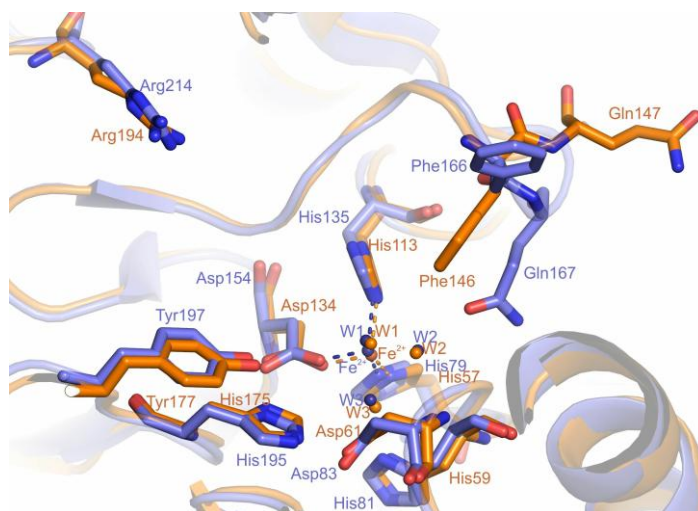
**а** — димер PDO *B. leptomitiformis*; элементы вторичной структуры одного из мономеров показаны разными цветами:  $\beta$ -слои — красным,  $\alpha$ -спирали — синим, петли — фиолетовым; **б** — слева направо: траектории  $C\alpha$ -атомов мономеров PDO *B. leptomitiformis* в составе димера, обозначенные оранжевым цветом, и траектории  $C\alpha$ -атомов мономеров hETHE1, обозначенные синим цветом (цит. по Rudenko *et al.*, 2024).

В образовании интерфейса димеризации PDO *B. leptomitiformis* участвовали поверхности, содержащие С-концевые участки мономеров, тогда как у hETHE1 (Рисунок 20б), PDO *A. thaliana* и MxPDO поверхности димеризации включали N-концевые участки белков (Sattler *et al.*, 2015; McCoy *et al.*, 2006). Различалась также площадь межмолекулярного интерфейса. У PDO *B. leptomitiformis* площадь интерфейса между мономерами была относительно небольшой и составляла  $997 \text{ \AA}^2$ , что было сопоставимо с соответствующим показателем для PDO *A. thaliana* (McCoy *et al.*, 2006). У hETHE1 общая площадь скрытой при димеризации поверхности была приблизительно в два раза больше и составляла  $1950 \text{ \AA}^2$  (Pettinati *et al.*, 2015). В формировании контактов между мономерами PDO *B. leptomitiformis* участвовали десять водородных связей и одно гидрофобное взаимодействие.

В активном центре PDO *B. leptomitiformis* аминокислотные остатки первой координационной сферы иона железа — His57, His113 и Asp134 — и три молекулы

воды были идентичны соответствующим компонентам других структур персульфиддиоксигеназ типа I (Рисунок 21) (Sattler *et al.*, 2015; Pettinati *et al.*, 2015; McCoy *et al.*, 2006; Rühl *et al.*, 2018). Субстрат в активном центре PDO *B. leptomitiformis* мог координироваться ионом железа и аминокислотными остатками Arg194, Tyr177 и Asp61 (Pettinati *et al.*, 2015; McCoy *et al.*, 2006; Kabil, Banerjee, 2012; Goudarzi *et al.*, 2018).

Полученная кристаллическая структура PDO *B. leptomitiformis* позволила провести сравнительный структурный анализ с активными центрами других персульфиддиоксигеназ типа I. Предполагаемый субстрат-связывающий карман PDO *B. leptomitiformis* сравнивали с соответствующими участками hETHE1, MxPDOI и BpPRF в комплексе с глутатионом.

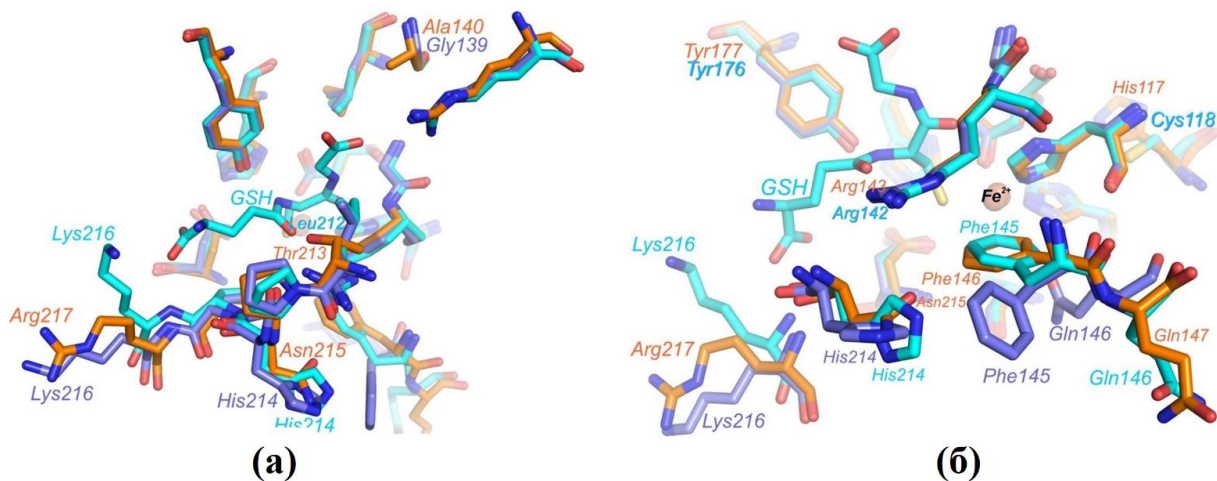


**Рисунок 21 — Суперпозиция структур активных центров PDO *B. leptomitiformis* и hETHE1**

Структура PDO *B. leptomitiformis* обозначена оранжевым цветом, структура hETHE1 — синим. Ионы железа и координирующие их молекулы воды W1, W2 и W3 показаны в виде сфер; координационные связи с ионом железа обозначены пунктирными линиями (цит. по Rudenko *et al.*, 2024).

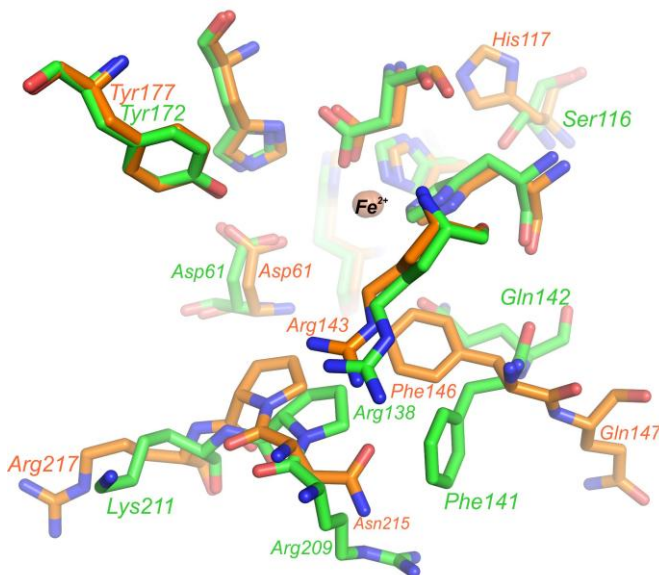
Как и у других персульфиддиоксигеназ типа I, аминокислотные остатки предполагаемого субстрат-связывающего кармана PDO *B. leptomitiformis* образовывали две стенки. Одна из них представляла собой структурно жесткую консервативную стенку, в состав которой, помимо других остатков, входили Arg194 и Tyr177. Противоположная стенка была структурно подвижной и формировалась двумя петлями (Рисунки 22 и 23). Одна из этих петель, содержащая Thr213, Asn215 и Arg217, характеризовалась большей вариабельностью как по форме, так и по заряду

(Рисунок 22а). В PDO *B. leptomitiformis* и BpPRF остаток Arg217 был ориентирован иначе, чем Lys216 в hETHE1. Кроме того, в PDO *B. leptomitiformis* в этой области находились Asn215 и Thr213 вместо His214 и Leu212, присутствующих в hETHE1 и BpPRF.



**Рисунок 22 — Суперпозиция структур активных центров PDO *B. leptomitiformis*, hETHE1 и BpPRF**

Структура PDO *B. leptomitiformis* обозначена оранжевым цветом, структура hETHE1 — голубым, структура BpPRF — сиреневым. На панелях (а) и (б) представлены разные проекции активных центров трех персульфиддиоксигеназ типа I (цит. по Rudenko *et al.*, 2024).



**Рисунок 23 — Суперпозиция структур активных центров PDO *B. leptomitiformis* и MxPDOI**

Структура PDO *B. leptomitiformis* обозначена оранжевым цветом, структура MxPDOI — зеленым. Ион железа показан в виде сферы (цит. по Rudenko *et al.*, 2024).

Во второй петле положение консервативных остатков Phe146 и Gln147 различалось у разных персульфиддиоксигеназ типа I (Рисунки 22б и 23) и, по-видимому, зависело от аминокислотного остатка в положении 148, которым мог быть Ala, Gln, Arg, Glu или Asn. У hETHE1 и MxPDOI полярная боковая группа Gln146 участвовала в формировании активного центра, тогда как гидрофобная боковая группа Phe145 была ориентирована в противоположную сторону. В PDO *B. leptomitiformis*, напротив, Phe146 вносил гидрофобный вклад в поверхность активного центра, а боковая группа Gln147 участвовала в образовании интерфейса димеризации. Сходное расположение этой петли наблюдалось в структуре активного центра BpPRF. Поворот фенильной группы фенилаланина мог влиять на расположение субстрата или продукта реакции в активном центре фермента.

Вторая координационная сфера иона железа в PDO *B. leptomitiformis* отличалась от соответствующей области других известных персульфиддиоксигеназ типа I одним аминокислотным остатком — His117. В эквивалентном положении у hETHE1 и BpPRF находился остаток цистеина (Рисунок 22б), а у MxPDOI — остаток серина (Рисунок 23). Боковая группа His117, в отличие от цистеина и серина в соответствующем положении, вытесняла молекулы воды, расположенные во внутренней полости фермента. Это могло стабилизировать сеть водородных связей вблизи активного центра и влиять на активность фермента.

Таким образом, при сохранении общей пространственной организации, характерной для персульфиддиоксигеназ типа I, выявленные особенности межмономерного интерфейса и субстрат-связывающего кармана указывали на структурную специфику PDO *B. leptomitiformis*.

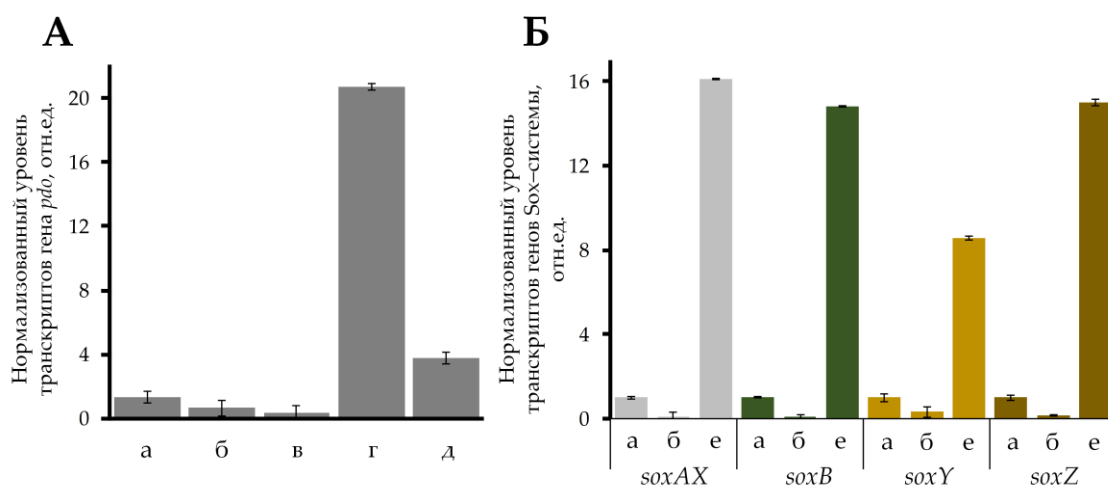
### 3.2.5 Количественный анализ экспрессии генов *pdo* и *soxAXBYZ*

Продолжительные наблюдения за *B. leptomitiformis* D-402 в течение 25 суток хемолитоавтотрофного роста в присутствии внутриклеточной элементной серы показали, что в первые семь суток ее количество в клетках постепенно уменьшалось, после чего внутриклеточные включения серы образовывались повторно.

Для проверки участия выявленной персульфиддиоксигеназы в превращении элементной серы у *B. leptomitiformis* D-402 экспрессию гена *pdo* анализировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени при хемолитоавтотрофном росте штамма, в ходе которого внутриклеточная элементная сера служила донором электронов для

энергетического метаболизма, тогда как в качестве контрольных условий использовали органогетеротрофный рост на лактате и хемолитоавтотрофный рост в присутствии сульфида как донора электронов.

Экспрессию гена *pdo* оценивали в сроки, охватывавшие период уменьшения количества внутриклеточных серных включений. Максимальная экспрессия *pdo* наблюдалась на седьмые сутки культивирования в присутствии внутриклеточной элементной серы как единственного источника энергии (Рисунок 24А). В этих условиях экспрессия гена *pdo* в среднем в 35 раз превышала значения, установленные в другие сроки культивирования, и в среднем в 25 раз — значения, полученные в контрольных условиях (Рисунок 24А).



**Рисунок 24 — Экспрессия гена *pdo* (А) и генов Sox-системы (Б) у *B. leptomitiformis* D-402**

а — хемолитоавтотрофный рост в присутствии  $\text{Na}_2\text{S}$ , экспоненциальная фаза роста (3-и сутки); б — органогетеротрофный 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).

В связи с повторным образованием внутриклеточных серных включений экспрессию генов Sox-системы определяли в сроки, охватывавшие соответствующую фазу роста. Максимальная экспрессия исследованных генов Sox-системы наблюдалась на 18-е сутки культивирования в присутствии внутриклеточной элементной серы (Рисунок 24Б). По сравнению с хемолитоавтотрофным ростом в присутствии сульфида экспрессия генов *soxAX* и *soxB* была в среднем в 15 раз выше, а экспрессия *soxY* — в

8,6 раза выше. При органогетеротрофном росте экспрессия генов Sox-системы была минимальной и соответствовала величине приборной погрешности.

Полученные результаты косвенно подтверждали возможность реализации у *B. leptomitiformis* механизма, сходного с описанным у других сероокисляющих гетеротрофных бактерий (Xin *et al.*, 2020). При неферментативном взаимодействии сульфита с сульфановой серой в цитоплазме образуется тиосульфат, который, вероятно, транспортируется в периплазму с участием неизвестных белков-переносчиков. В периплазме тиосульфат окисляется разветвленной Sox-системой с образованием элементной серы и сульфата. Такой механизм может объяснять повторное накопление внутриклеточной элементной серы у штамма D-402. Для *B. leptomitiformis* окисление тиосульфата является энергодающей реакцией, в которой тиосульфат служит донором электронов для энергетического метаболизма.

### **3.2.6 Промежуточные продукты, выявленные при культивировании *B. leptomitiformis* D-402 на обедненной минеральной среде в присутствии внутриклеточной элементной серы**

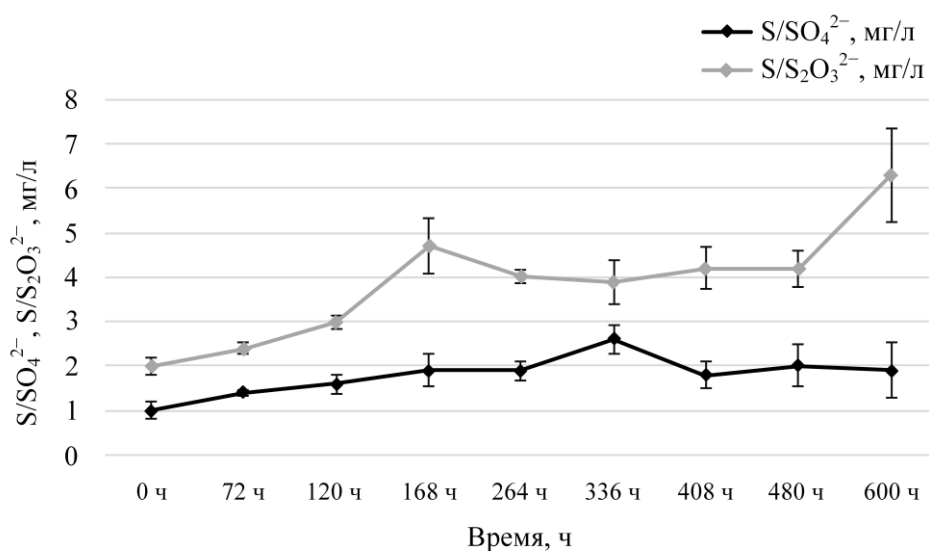
Для проверки предложенной гипотезы исследовали промежуточные продукты, образующиеся при хемолитоавтотрофном росте *B. leptomitiformis* D-402 в присутствии внутриклеточной элементной серы и  $\text{NaHCO}_3$ . Пробы отбирали в сроки, охватывавшие период уменьшения количества внутриклеточных серных включений и фазу их повторного образования.

В течение трех суток хемолитоавтотрофного роста D-402 в присутствии сульфида в качестве донора электронов клетки накапливали внутриклеточную элементную серу, а прирост белка составлял 24 мг/л. Ранее было показано, что содержание внутриклеточной серы у представителей рода *Beggiatoa* и пурпурных серных бактерий может достигать 70 % сухой массы клеток (Nelson, Castenholz, 1981; Overmann, 1997). После переноса инокулята в обедненную минеральную среду, содержащую  $\text{NaHCO}_3$  в качестве источника неорганического углерода и не содержащую добавленных серосодержащих соединений, в течение семи суток наблюдалось постепенное уменьшение количества элементной серы в клетках практически до ее полного исчезновения, тогда как содержание белка увеличивалось до 28 мг/л. На седьмые сутки культивирования в присутствии внутриклеточной

элементарной серы как единственного источника энергии также наблюдалась максимальная экспрессия гена *pdo*.

После 14 суток культивирования в этих условиях у штамма D-402 вновь появлялись внутриклеточные серные включения. К 24-м суткам постепенно уменьшалось количество жизнеспособных клеток, тогда как количество повторно образовавшихся серных включений не изменялось.

Хотя при окислении сульфановой серы с участием PDO образуется сульфит, среди продуктов, помимо внутриклеточной элементарной серы, были выявлены только тиосульфат и сульфат (Рисунок 25). Тиосульфат и сульфат накапливались в низких концентрациях.



**Рисунок 25 — Промежуточные продукты, выявленные при хемолитоавтотрофном росте *B. leptomitiformis* D-402 в присутствии внутриклеточной элементарной серы**

Серой кривой показана концентрация тиосульфата, черной — концентрация сульфата.

Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям, рассчитанным по результатам трех параллельных химических измерений. На графике представлены девять точек, соответствующих 600 ч (25 суткам) культивирования штамма D-402 в присутствии только внутриклеточной элементарной серы и NaHCO<sub>3</sub> (цит. по Rudenko *et al.*, 2024).

Отсутствие сульфита среди выявленных продуктов может быть связано с тем, что образующийся сульфит не накапливался в среде, а быстро вступал в неферментативную реакцию с сульфановой серой с образованием тиосульфата, как это было показано для других гетеротрофных бактерий (Sattler *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2017; Xin *et al.*, 2016; Hou *et al.*, 2018).

В геноме *B. leptomitiformis* присутствуют гены мембраносвязанной цитоплазматической сульфит:хиноноксидоредуктазы SoeABC, поэтому этот комплекс потенциально мог участвовать в окислении сульфита, образующегося в реакции PDO. Однако ранее было показано, что у *B. leptomitiformis* активность SoeABC проявлялась только в микроаэробных условиях, тогда как рассматриваемый процесс протекал в аэробных условиях (Rudenko *et al.*, 2020). Это согласуется с результатами протеомного анализа аэробно выращенных культур, в которых ни один из белков комплекса SoeABC выявлен не был.

Повторное образование внутриклеточных серных включений и выявление тиосульфата и сульфата указывали на возможное участие разветвленной Sox-системы, которая у *B. leptomitiformis* функционирует без белков SoxCD и окисляет тиосульфат с образованием сульфата и элементной серы, накапливающейся в клетках. Поэтому тиосульфат, вероятно, образуется при вторичном химическом взаимодействии сульфита с сульфановой серой, после чего окисляется в периплазме с участием разветвленной Sox-системы. В результате образуется сульфат и элементная сера, повторно накапливающаяся в клетках. Возможность реализации этого механизма также согласуется с результатами ОТ-ПЦР в реальном времени и протеомного анализа.

При этом снижения концентрации тиосульфата на фоне накопления сульфата не наблюдалось. Вероятно, это связано с пространственным разделением процессов образования и окисления тиосульфата: тиосульфат образовывался в цитоплазме, тогда как его окисление Sox-системой происходило в периплазме.

Образование тиосульфата и его последующее диссимиляционное превращение имеют принципиальное значение для *B. leptomitiformis*, поскольку реакция, катализируемая PDO, сама по себе не сопровождается образованием энергии. Вместе с тем штамм D-402 рос при использовании внутриклеточной элементной серы как единственного источника энергии и  $\text{NaHCO}_3$  как единственного источника углерода. Следовательно, образующийся тиосульфат, вероятно, служит промежуточным донором электронов: его последующее окисление разветвленной Sox-системой обеспечивает энергетически значимый этап превращения внутриклеточной серы у *B. leptomitiformis*.

Полученные данные позволили предположить, что окисление серы до сульфита у *B. leptomitiformis* D-402 катализируется персульфиддигидрогеназой по механизму,



снижалось почти до неопределяемого уровня. За это время около 400 мкМ тиосульфата было окислено с образованием примерно 800 мкМ сульфата, что авторы связывают с дальнейшим окислением накопленной сульфановой серы с участием PDO (Xin *et al.*, 2023). Благодаря заключению элементной серы в белковую оболочку у *B. leptomitiformis* отсутствует необходимость в ее быстром удалении для предотвращения потенциального токсического воздействия на клетку. Это позволяет бактериям длительно сохранять элементную серу в качестве энергетического резерва и повторно включать ее в энергетический метаболизм при необходимости.

### 3.3 Филогенетическое положение и метаболический потенциал новых представителей семейства *Beggiatoaceae*

Изучение таксономического разнообразия семейства *Beggiatoaceae* долгое время было ограничено сложностью культивирования его представителей, о чем свидетельствуют немногочисленные чистые культуры, полученные на сегодня только для трех видов. Поэтому разнообразие семейства, установленное традиционными микробиологическими методами, отражает лишь небольшую часть существующих таксонов. Развитие технологий секвенирования и метагеномного анализа позволило получать MAG некультивируемых представителей и определять их филогенетическое положение. В настоящее время наиболее полное представление о таксономическом разнообразии *Beggiatoaceae* дает GTDB, состав которого значительно превышает число описанных родов. Вместе с тем многие выявленные в GTDB кандидатные рода сохраняют временные буквенно-цифровые обозначения. Определение их соответствия ранее описанным родам требует совместного анализа геномных и филогенетических данных, последовательностей генов 16S рРНК и, при наличии, морфологических признаков.

На момент выполнения работы семейство *Beggiatoaceae* включало в GTDB (релиз R09-RS220) 25 родов и 64 геномные последовательности. Только шесть родов согласно геномным данным были соотнесены с ранее описанными таксонами и имели названия *Beggiatoa*, *Marithrix*, *Thioflexithrix*, *Thiomargarita*, *Thioploca* и “*Ca. Venteria*”. В настоящей работе кандидатный род «UBA10656» был отнесен к ранее описанному роду “*Ca. Parabeggiatoa*”, а для кандидатного рода «BB20» предложено название “*Ca. Albibeggiatoa*”. Таким образом, число родов *Beggiatoaceae*, соотнесенных с описанными таксонами, увеличилось до восьми (Ravin *et al.*, 2024).

База GTDB регулярно обновляется по мере поступления новых геномных последовательностей и пересмотра их классификации. В релизе R11-RS232 семейство *Beggiatoaceae* включает уже 27 родов и 78 геномных последовательностей ([https://gtdb.ecogenomic.org/tree?r=f\\_\\_Beggiatoaceae](https://gtdb.ecogenomic.org/tree?r=f__Beggiatoaceae), дата обращения: 19.06.2026). Однако число родов, соотнесенных с описанными таксонами, не изменилось: ими остаются те же восемь родов, включая “*Ca. Parabeggiatoa*” и “*Ca. Albibeggiatoa*”. Увеличение общего числа родов связано с выделением двух новых кандидатных родов SAYFOB01 и CAZKST01, сохраняющих временные буквенно-цифровые обозначения. В настоящее время число геномов “*Ca. Parabeggiatoa*” увеличилось с семи до 13, а “*Ca. Albibeggiatoa*” — с трех до четырех. Таким образом, в этих двух родах появилось семь дополнительных геномных последовательностей: шесть у “*Ca. Parabeggiatoa*” и одна у “*Ca. Albibeggiatoa*”. В каждом роде также был выделен один дополнительный вид.

Последующие обновления GTDB не изменили таксономическое положение MAG WS\_Bin1 и WS\_Bin3 и основные выводы исследования. Поскольку его целью являлись определение филогенетического положения этих MAG и уточнение статуса соответствующих кандидатных родов, а не исчерпывающая ревизия всего семейства *Beggiatoaceae*, результаты представлены для набора геномов, использованного при выполнении работы. Новые геномы расширили представления о внутривидовом и видовом разнообразии двух родов, но не потребовали пересмотра отнесения «UBA10656» и «BB20» к “*Ca. Parabeggiatoa*” и “*Ca. Albibeggiatoa*” соответственно.

### 3.3.1 Характеристика биотопа

Биотоп, в котором проводили поиск сероокисляющих бактерий семейства *Beggiatoaceae*, расположен в прибрежно-морской зоне в районе Беломорской биологической станции имени Н. А. Перцова биологического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (поселок Приморский, Республика Карелия, Россия) (Рисунок 27а). Участок отбора морских проб находился в бухте Белого моря, называемой «Ламинариевая помойка», приблизительно в 100 м от морского пирса Беломорской биологической станции имени Н. А. Перцова (Рисунок 27б). Здесь на глубине 15–18 м накапливаются слои разлагающихся талломов ламинарии, переносимых естественными морскими подводными течениями. На поверхности разлагающихся талломов ламинарии формируются интенсивно развитые

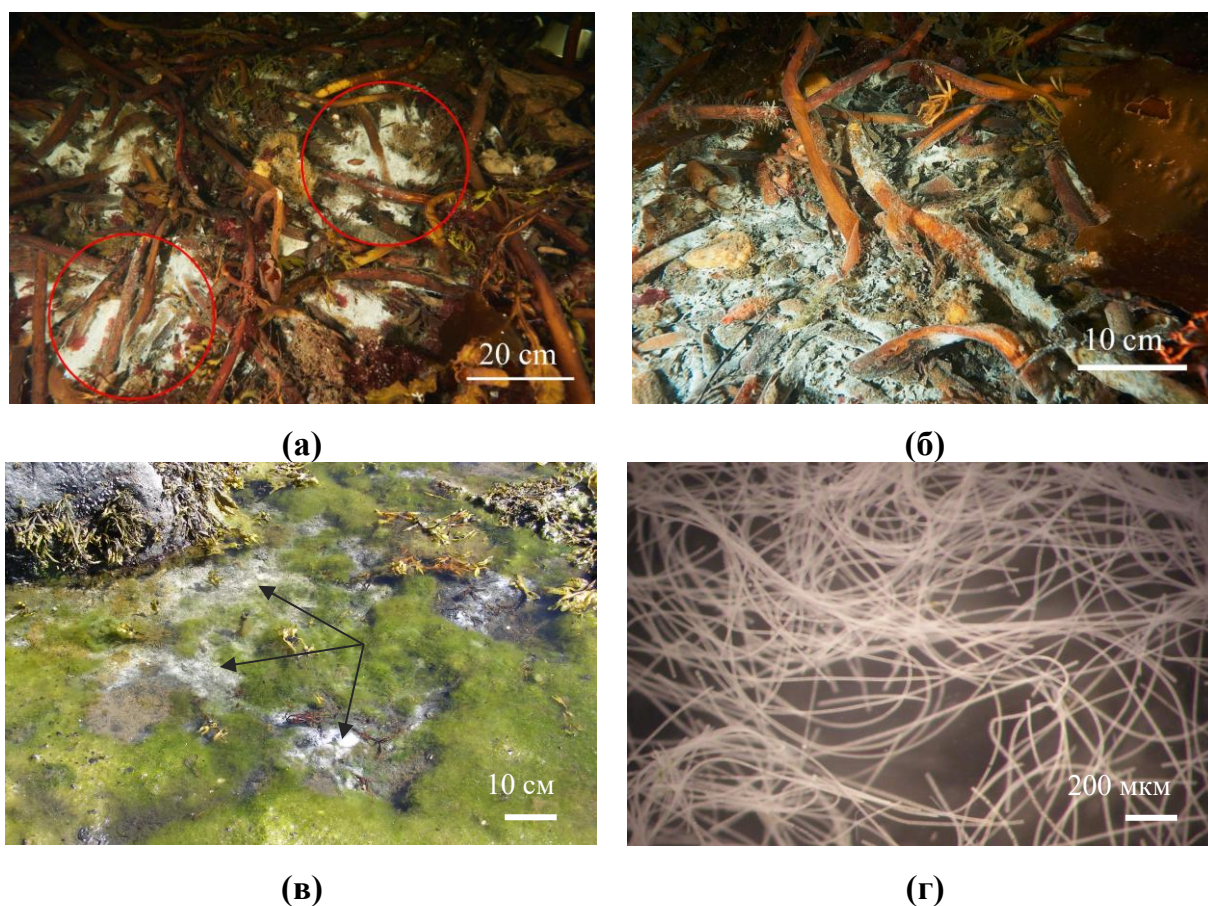
беловатые серные маты. Дно участка «Ламинариевая помойка» сильно заилено и насыщено разлагающейся органикой. Здесь происходит интенсивное образование сероводорода. Биотоп характеризовался следующими показателями: концентрация NaCl составляла 20 г/л, концентрация кислорода в зоне формирования матов — 0,5–1,0 мг/л, концентрация сульфида — 0,13 мМ, температура морской воды —  $+10 \pm 4$  °С, pH — 7,5–8,0.



**Рисунок 27 — Географическое расположение района проведения полевых работ и участка отбора биологических проб**

**а** — Беломорская биологическая станция имени Н. А. Перцова биологического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова на побережье Белого моря; красной меткой обозначен поселок Приморский Республики Карелия, Россия; **б** — участок отбора биологических проб в бухте «Ламинариевая помойка» вблизи морского пирса, обозначенный красной меткой. Морской пирс виден в центре территории станции как белое сооружение на краю берега, выступающее в бухту (цит. по Ravin *et al.*, 2024).

Для метагеномного анализа образцы бактериальных серных матов, сформированных на остатках ламинарии, отбирали в бухте Белого моря «Ламинариевая помойка», расположенной в 100 м к северо-востоку от морского пирса Беломорской биологической станции имени Н. А. Перцова ( $66^{\circ}34'16,94''$  с. ш.,  $33^{\circ}06'23,44''$  в. д.) (Рисунок 28а, б). Пробы отбирали 7 августа 2023 г. на глубине 15 м при температуре морской воды 14 °С. Следует отметить, что серные маты, содержавшие гигантские нити бесцветных сероокисляющих бактерий семейства *Beggiatoaceae*, были также обнаружены в приливно-отливной зоне Белого моря (Рисунок 28в, г).



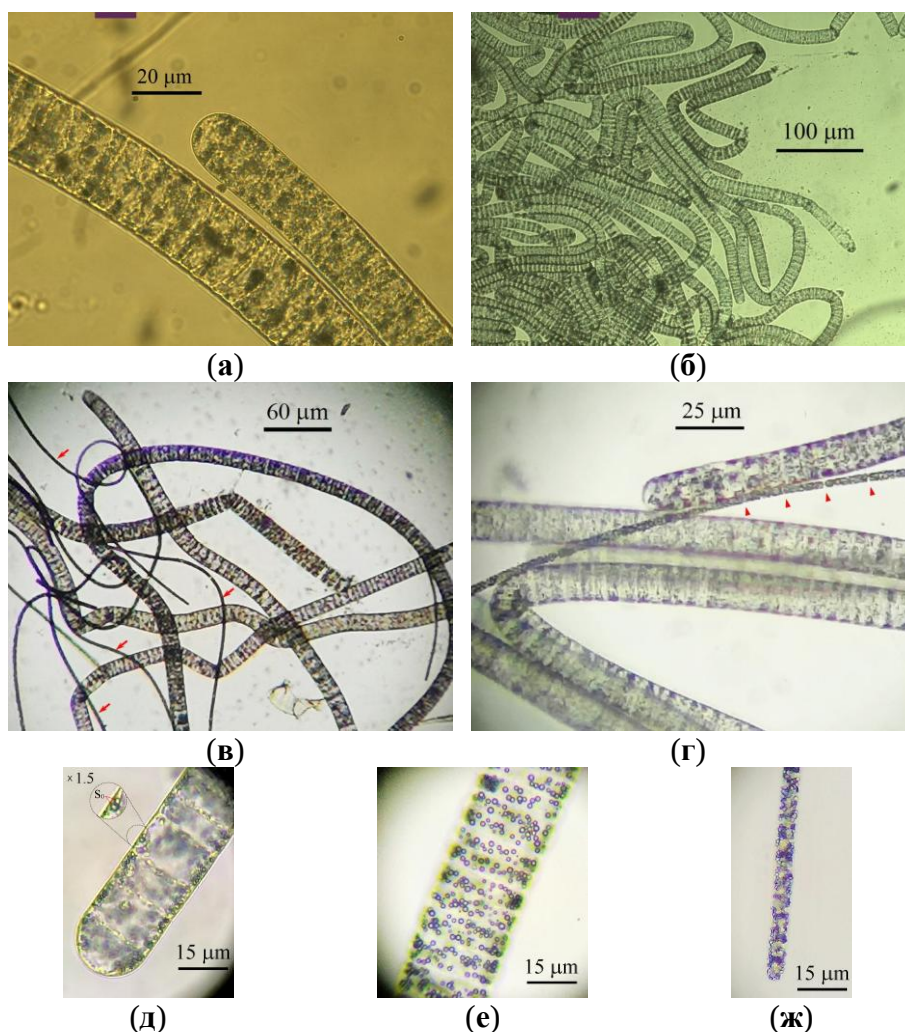
**Рисунок 28 — Общий вид бактериальных серных матов, представлявших собой неоднородный беловатый покров, сформированный представителями семейства *Beggiatoaceae***

**а, б** — маты на разлагающихся талломах ламинарии на морском дне участка «Ламинариевая помойка» в Белом море, подводная съемка: **а** — слабо развитые беловатые маты, обведенные красным; **б** — интенсивно развитые беловатые маты; **в** — приливно-отливная зона Белого моря, отдельные маты обозначены красными стрелками; изображение получено с использованием бинокулярного микроскопа Nikon SMZ445; **г** — увеличенное изображение нитей, собранных из серных матов в приливно-отливной зоне (цит. по Ravin *et al.*, 2024).

### 3.3.2 Морфология нитчатых бесцветных сероокисляющих бактерий из серных матов

Микроскопический анализ нитчатых бесцветных сероокисляющих бактерий из отобранных бактериальных серных матов выявил два типа нитей — крупные и среднего размера, морфология которых была характерна для представителей семейства *Beggiatoaceae* (Рисунок 29а–г). Нити первого типа состояли из крупных бесцветных дисковидных клеток размером  $18,0\text{--}20,0 \times 8,0\text{--}10,0$  мкм с округлыми концами и образовывали трихомы длиной до 900 мкм (Рисунок 29а, б, д, е). Клетки содержали внутриклеточные включения элементной серы (Рисунок 29д, е). Помимо включений элементной серы, в крупных клетках предположительно присутствовали вакуоли. По

морфологии эти клетки были сходны с клетками представителей родов “*Ca. Parabeggiatoa*” и “*Ca. Isobeggiatoa*”, в частности “*Ca. Isobeggiatoa divolgata*” (Mußmann *et al.*, 2003; Salman *et al.*, 2011). Нити были способны к скользящему движению.



**Рисунок 29 — Микроскопические изображения нитей из бактериальных серных матов, собранных в бухте Белого моря «Ламинариевая помойка»**

**а, б, д, е** — морфология крупных клеток нитчатых бесцветных сероокисляющих бактерий; **в, г, ж** — морфология клеток среднего размера, обозначенных красными стрелками. **а, д, е** — крупные дисковидные клетки; **г** — цилиндрические клетки среднего размера; красными наконечниками стрелок обозначены границы между соседними клетками. На панелях **д–ж** показаны многочисленные округлые включения, сильно преломляющие свет и представленные у сероокисляющих бактерий глобулами элементарной серы: **д, е** — в крупных клетках; **ж** — в клетках бактерий среднего размера. На панели **д** показано накопление глобул элементарной серы в крупных клетках; отдельные глобулы представлены при увеличении в 1,5 раза на вставке в левом верхнем углу и обозначены красными стрелками. Панель **а** получена методом фазово-контрастной микроскопии, панели **б–ж** — методом световой микроскопии (цит. по Ravin *et al.*, 2024).

Клетки нитей средних размеров имели размеры 1,0–2,5 × 3,5–4,0 мкм, цилиндрическую форму и округлые концы и образовывали трихомы длиной до 300 мкм (Рисунок 29в, г). Вакуоли в них отсутствовали, однако присутствовали внутриклеточные глобулы серы (Рисунок 29ж). Трихомы были способны к скользящему движению.

### 3.3.3 Сборка MAG представителей семейства *Beggiatoaceae*

Из полученных метагеномов были собраны два MAG представителей семейства *Beggiatoaceae* — MAG WS\_Bin1 и MAG WS\_Bin3 (Таблица 11). MAG WS\_Bin1 был собран из 1575 контигов с N50 6604 п. н. и общей длиной 8 639 748 п. н. Согласно оценке CheckM2, полнота MAG составляет 91,63 %, а возможный уровень контаминации — 3,05 %. При аннотации генома выявлены один ген 16S рРНК, 45 генов тРНК и 6942 потенциальных белок-кодирующих гена. Содержание GC в геноме составляет 41,0 %.

**Таблица 11 — Общая характеристика MAG WS\_Bin1 и WS\_Bin3, собранных из метагеномов серных матов бухты «Ламинариевая помойка», и филогенетически родственных геномов из базы данных GenBank (цит. по Ravin *et al.*, 2024)**

| Геном (MAG)                             | Идентификатор сборки | Размер генома, млн п. н. | Число контиго в | Содержание GC, % | Гены                  |          |      |
|-----------------------------------------|----------------------|--------------------------|-----------------|------------------|-----------------------|----------|------|
|                                         |                      |                          |                 |                  | Белок-кодирующие гены | 16S рРНК | тРНК |
| <i>Beggiatoaceae</i> sp. WS_Bin1        | GCA_035871815.1      | 8,64                     | 1 575           | 41,0             | 6 942                 | 1        | 45   |
| <i>Beggiatoaceae</i> sp. WS_Bin3        | GCA_035829175.1      | 3,64                     | 708             | 38,0             | 2 800                 | 1        | 33   |
| MAG B3_G6                               | GCA_003646175.1      | 8,8                      | 1 343           | 41,8             | 6 453                 | 0        | 56   |
| MAG B38_G9                              | GCA_003646135.1      | 9,4                      | 888             | 42,9             | 6 502                 | 0        | 64   |
| MAG 4572_84                             | GCA_002085445.1      | 8,5                      | 406             | 42,8             | 6 041                 | 0        | 53   |
| MAG B2_G13                              | GCA_003645315.1      | 8,3                      | 1 040           | 41,0             | 6 541                 | 0        | 43   |
| MAG B37_G9                              | GCA_003645245.1      | 8,2                      | 977             | 40,9             | 6 555                 | 0        | 47   |
| MAG B5_G6                               | GCA_003645185.1      | 8,4                      | 853             | 40,9             | 6 645                 | 0        | 40   |
| MAG BB20                                | GCA_016744725.1      | 4,5                      | 296             | 37,9             | 3 939                 | 0        | 31   |
| <i>Thiotrichaceae</i> sp. R2S4C1D_S41.0 | GCA_025800385.1      | 4,8                      | 257             | 38,5             | 3 584                 | 1        | 38   |

MAG WS\_Bin3 был собран из 708 контигов с N50 6229 п. н. и общей длиной 3 641 550 п. н. Согласно оценке CheckM2, полнота сборки генома составляет 95,95 %, а возможный уровень контаминации — 1,29 %. При аннотации генома выявлены один ген 16S рРНК, 33 гена тРНК и 2800 потенциальных белок-кодирующих генов. Содержание GC в геноме составляло 38,0 %.

### 3.3.4 Филогенетический анализ MAG *Beggiatoaceae* sp. WS\_Bin1

Анализ родства по последовательности гена 16S рРНК показал, что MAG *Beggiatoaceae* sp. WS\_Bin1 имел 99,87 % сходства с видом “*Candidatus Parabeggiatoa communis*”, относящимся к роду “*Ca. Parabeggiatoa*”. Геномные последовательности представителей этого рода ранее отсутствовали. Род был описан Salman *et al.* в 2011 г. только на основании идентичности последовательностей генов 16S рРНК (Salman *et al.*, 2011). На основании сходства последовательностей генов 16S рРНК полученный MAG WS\_Bin1 отнесен к ранее описанному виду “*Ca. Parabeggiatoa communis*” рода “*Ca. Parabeggiatoa*”.

Согласно GTDB, WS\_Bin1 относится к семейству *Beggiatoaceae* и входит в неидентифицированный род «UBA10656», включающий шесть геномов: MAG 4572\_84, MAG B3\_G6, MAG B38\_G9, MAG B2\_G13, MAG B37\_G9 и MAG B5\_G6 (Dombrowski *et al.*, 2017; Dombrowski *et al.*, 2018).

Значения попарной аминокислотной идентичности (AAI) между MAG WS\_Bin1 и другими включенными в анализ геномами находились в диапазоне 66,49–83,89 % и превышали принятое для разграничения родов пороговое значение 65 % (Рисунок 30). Это позволило однозначно отнести группу «UBA10656» и полученный MAG WS\_Bin1 к роду “*Ca. Parabeggiatoa*”, описанному Salman *et al.* в 2011 г. (Salman *et al.*, 2011; Konstantinidis *et al.*, 2017).

Значения попарной нуклеотидной идентичности (ANI), рассчитанные для геномов представителей рода “*Ca. Parabeggiatoa*”, находились в диапазоне 75,15–88,76 % (Рисунок 30). Полученные данные позволили выделить среди семи MAG группы «UBA10656» четыре самостоятельных вида рода “*Ca. Parabeggiatoa*”: “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. nov., представленный MAG B3\_G6; “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. nov., представленный двумя MAG 4572\_84 и B38\_G9; “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. nov., представленный тремя MAG B5\_G6, B37\_G9 и B2\_G13; а также полученный MAG WS\_Bin1, отнесенный к виду “*Ca. Parabeggiatoa communis*”. Для этих видов

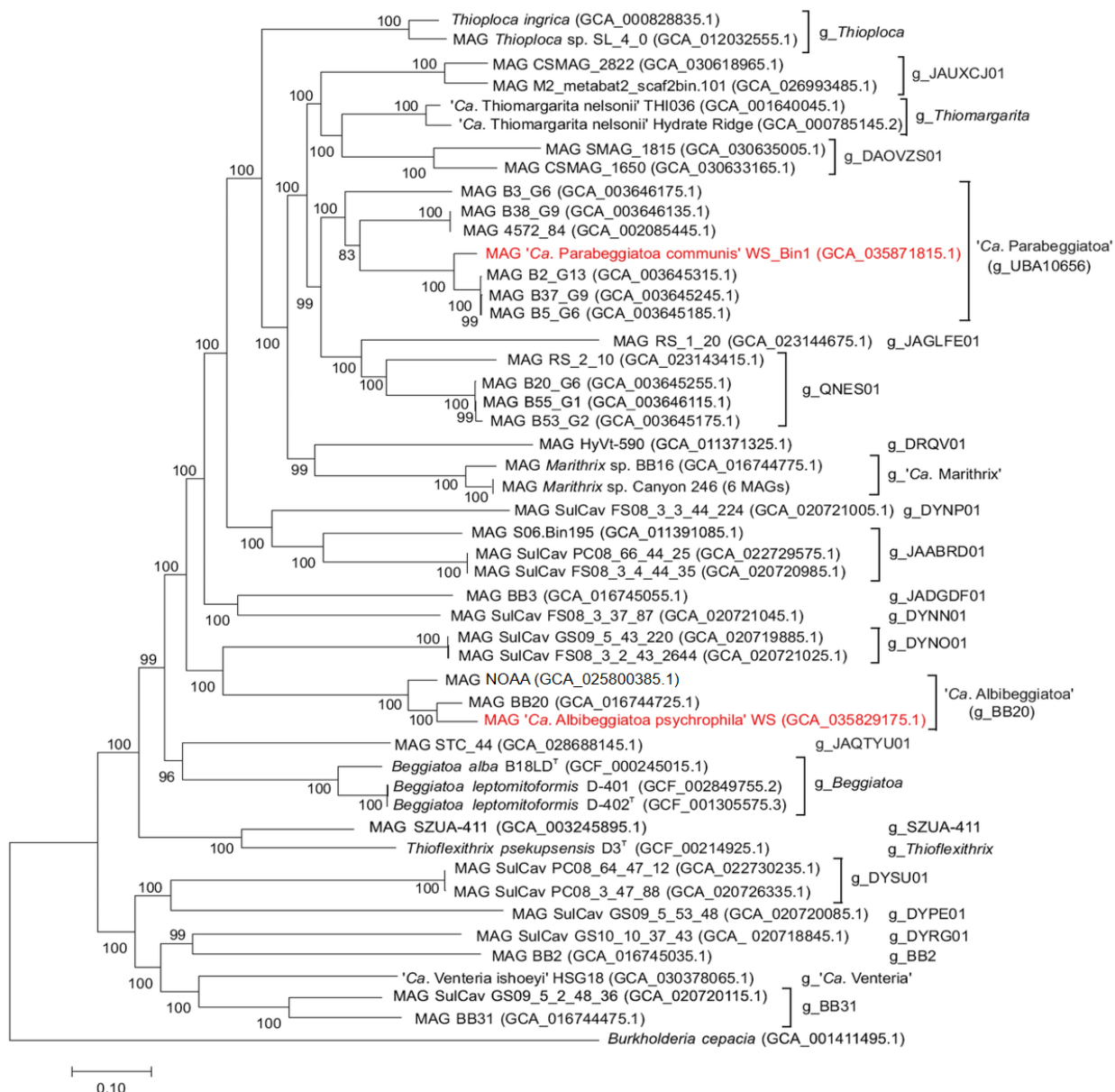
введены следующие обозначения: “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. nov. 1 для MAG B3\_G6; “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. nov. 2 для двух MAG 4572\_84 и B38\_G9; “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. nov. 3 для трех MAG B5\_G6, B37\_G9 и B2\_G13.

|        | MAG B3_G6 | MAG B38_G9 | MAG 4572_84 | MAG B2_G13 | MAG B37_G9 | MAG B5_G6 | MAG WS_Bin1 | ANI, % |
|--------|-----------|------------|-------------|------------|------------|-----------|-------------|--------|
|        | 100       | 78,25      | 77,96       | 74,93      | 74,85      | 74,91     | 75,15       | 100    |
|        | 70,61     | 100        | 98,91       | 75,34      | 75,32      | 75,37     | 75,47       | 75     |
| AAI, % | 69,41     | 99,38      | 100         | 75,31      | 75,31      | 75,29     | 75,40       |        |
|        | 66,69     | 68,75      | 67,77       | 100        | 99,31      | 99,60     | 88,49       |        |
|        | 66,60     | 68,67      | 67,71       | 99,67      | 100        | 99,59     | 88,76       |        |
|        | 66,43     | 68,71      | 67,65       | 99,87      | 99,59      | 100       | 88,59       |        |
|        | 66,49     | 68,52      | 67,27       | 84,19      | 83,94      | 83,89     | 100         |        |

**Рисунок 30 — Тепловая карта значений AAI и ANI между геномами представителей рода “*Ca. Parabeggiatoa*”**

В анализ включены MAG WS\_Bin1 (GCA\_035871815.1), B3\_G6 (GCA\_003646175.1), 4572\_84 (GCA\_002085445.1), B38\_G9 (GCA\_003646135.1), B5\_G6 (GCA\_003645185.1), B37\_G9 (GCA\_003645245.1) и B2\_G13 (GCA\_003645315.1) (цит. по Ravin *et al.*, 2024).

Положение геномов на филогенетическом дереве определяли на основании конкатенированных аминокислотных последовательностей 120 консервативных маркерных генов (Рисунок 31).



**Рисунок 31 — Филогенетическое дерево представителей семейства *Beggiatoaceae*, построенное на основании геномных последовательностей**

Положение геномов определено 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 *et al.*, 2024).

### 3.3.5 Филогенетический анализ MAG *Beggiatoaceae* sp. WS\_Bin3

Поиск BLAST с использованием последовательности гена 16S рPHK MAG *Beggiatoaceae* sp. WS\_Bin3 выявил 97,24 % сходства и различия на видовом уровне с морским штаммом *Beggiatoa* sp. 35Flor, который ранее был отнесен к роду *Beggiatoa* на основании сходных морфологических и физиологических признаков. Сходство последовательности гена 16S рPHK *Beggiatoa* sp. 35Flor с соответствующими

последовательностями типичных представителей рода *Beggiatoa* составляет 85,95 %, что ниже порогового значения для разграничения родов. Однако из-за отсутствия чистой культуры и геномной последовательности штамм *Beggiatoa* sp. 35Flor до настоящего времени не имел определенного таксономического статуса.

Согласно GTDB, MAG WS\_Bin3 относится к семейству *Beggiatoaceae* и входит в кандидатный род «BB20», представленный единственным геномом MAG BB20. Значение попарной ANI между этими двумя геномами составляло 84,23 %. Полученное значение позволило отнести геномы к двум разным видам нового рода “*Ca. Albibeggiatoa*” gen. nov., для которых предложены названия “*Candidatus Albibeggiatoa psychrophila*” gen. nov., sp. nov. WS и “*Ca. Albibeggiatoa*” sp. nov. BB20. Таким образом, был уточнен таксономический статус кандидатного рода «BB20», для которого предложено название “*Ca. Albibeggiatoa*” gen. nov.

Дополнительный поиск BLAST с использованием последовательности гена *tilS* из MAG WS\_Bin3 выявил геномную последовательность *Thiotrichaceae* sp. R2S4C1D\_S41.012 (Rosales *et al.*, 2022). Степень сходства гена *tilS* отражает филогенетические связи в пределах рода *Thiothrix*, однако применительно к семейству *Beggiatoaceae* проведенный анализ носит предварительный характер и выполнен для поиска новых геномных последовательностей (Ravin *et al.*, 2023). Значения ANI генома R2S4C1D\_S41.012 относительно геномов “*Ca. Albibeggiatoa psychrophila*” и “*Ca. Albibeggiatoa*” sp. nov. BB20 составляли соответственно 79,9 и 84,23 %. Полученные значения позволили отнести *Thiotrichaceae* sp. R2S4C1D\_S41.012 к новому виду рода “*Ca. Albibeggiatoa*”, обозначенному как “*Ca. Albibeggiatoa*” sp. nov. NOAA.

Положение геномов на филогенетическом дереве определяли на основании конкатенированных аминокислотных последовательностей 120 консервативных маркерных генов (Рисунок 31).

Полная геномная последовательность *Beggiatoa* sp. 35Flor отсутствует, поэтому установление таксономического статуса этого штамма затруднено. На основании сходства последовательностей генов 16S рРНК штамм однозначно отнесен к роду “*Ca. Albibeggiatoa*”. Однако определить, представляет ли *Beggiatoa* sp. 35Flor новый вид этого рода или относится к одному из существующих видов — “*Ca. Albibeggiatoa*” sp. nov. BB20 либо “*Ca. Albibeggiatoa*” sp. nov. NOAA, —

невозможно. Поэтому предложено реклассифицировать этот штамм и обозначить его как “*Ca. Albibeggiatoa*” sp. 35Flor comb. nov.

### 3.3.6 Геномный анализ основных метаболических путей представителей рода “*Ca. Parabeggiatoa*”

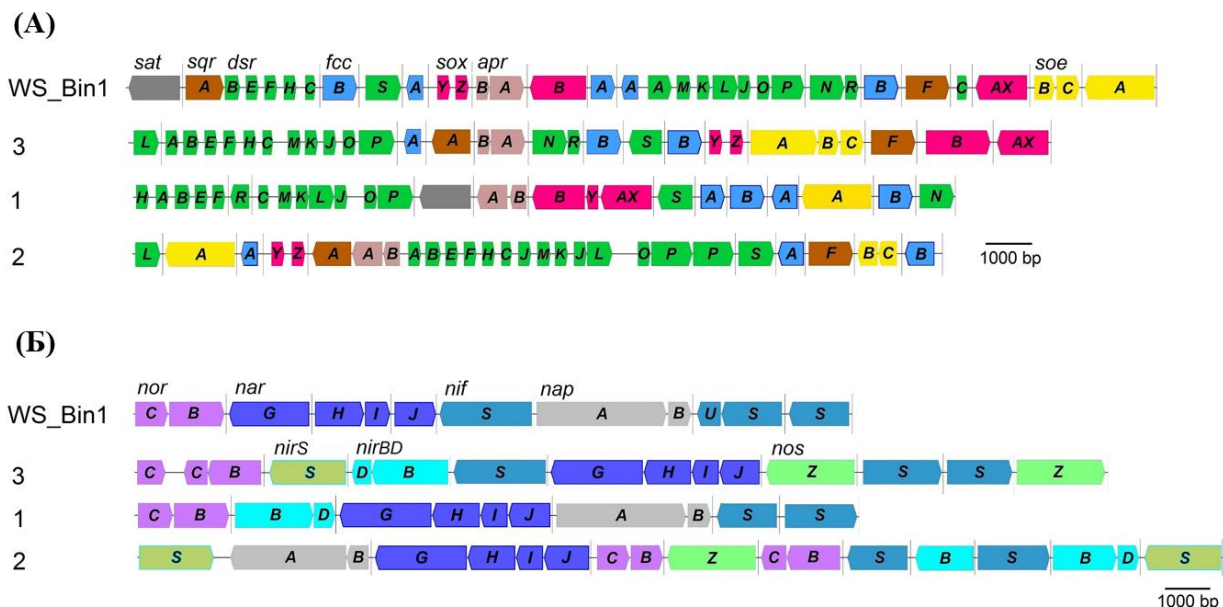
Чистая культура представителей рода “*Ca. Parabeggiatoa*” до настоящего времени не получена, поэтому все сведения об их метаболизме основаны на наблюдениях за бактериями в природных ассоциациях. Все представители рода “*Ca. Parabeggiatoa*”, как и другие представители семейства *Beggiatoaceae*, относятся к сероокисляющим бактериям. Они образуют обильные серные маты в природных и антропогенных водоемах с высоким содержанием сероводорода (Saravanakumar *et al.*, 2012).

При аннотации геномов “*Ca. Parabeggiatoa*” был выявлен набор систем, участвующих в диссимиляционном метаболизме серы (Рисунок 32). Эти результаты соответствуют немногочисленным данным о способности описанных представителей семейства *Beggiatoaceae* к литотрофному росту в присутствии восстановленных соединений серы (Dubinina *et al.*, 2017; Gureeva *et al.*, 2019; Berg *et al.*, 2014; Rudenko *et al.*, 2020). Они также указывают на активное участие этой группы бактерий в природном цикле соединений серы и поддержании устойчивого состояния экосистем.

У представителей рода “*Ca. Parabeggiatoa*” были выявлены две системы окисления сероводорода: SQR — сульфид:хиноноксидоредуктаза и FCSD — флавоцитохром-с-сульфиддегидрогеназа (Рисунок 32, Таблица 12).

Гены *sqrF* и *sqrA*, кодирующие SQR двух типов, были выявлены в геноме “*Ca. Parabeggiatoa communis*” WS\_Bin1, а также в MAG B5\_G6, B2\_G13, B38\_G9 и 4572\_84. В геноме B37\_G9 обнаружен только ген *sqrA*, тогда как в геноме B3\_G6 гены, кодирующие SQR, не выявлены.

Гены FCSD присутствуют в геномах всех представителей рода “*Ca. Parabeggiatoa*”. Окисление тиосульфата осуществляется разветвленной Sox-системой, в составе которой отсутствуют белки SoxCD (Рисунок 32, Таблица 12). Отдельные гены, кодирующие вторую субъединицу SoxAX — SoxX, в геномах не выявлены, а белок SoxAX является гибридным, как и у других представителей семейства *Beggiatoaceae* (Dubinina *et al.*, 2017; Gureeva *et al.*, 2019; Kappler, Maher, 2013).



**Рисунок 32 — Расположение генов, кодирующих ферменты диссимиляционного метаболизма серы (А) и азота, а также фиксации молекулярного азота (Б) у представителей рода “*Ca. Parabeggiatoa*”**

WS\_Bin1 — “*Ca. Parabeggiatoa communis*”; 3 — “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. 3; 1 — “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. 1; 2 — “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. 2. *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; кластер генов *nif* — гены нитрогеназы; *sqr* — ген сульфид:хинооксидоредуктазы; *fccAB* — гены флавоцитохром-с-сульфиддегидрогеназы; *soxAXBYZ* — гены разветвленной Sox-системы; *rDsr* — комплекс окисления серы, кодируемый генами *dsrABEFHCKMLJOPNRS*; *soeABC* — гены хинонзависимой сульфитдегидрогеназы; *aprAB* — гены аденозин-5'-фосфосульфатредуктазы; *sat* — ген АТР-сульфуриказы. На панелях А и Б использованы разные цветовые палитры для обозначения генов различных систем; цвета на этих панелях не совпадают (цит. по Ravin *et al.*, 2024).

Гены Sox-системы присутствуют в геномах всех видов, однако в некоторых MAG отдельные гены системы не представлены. Ген *soxAX*, продукт которого инициирует первую реакцию мультиферментного комплекса при окислении тиосульфата, не выявлен в геноме MAG 4572\_84. В геноме B3\_G6 отсутствует ген *soxZ*, продукт которого совместно с SoxY участвует в связывании тиосульфата. В геноме MAG B2\_G13 отсутствует ген, кодирующий SoxB, участвующий в реакции гидролиза (Sauvé *et al.*, 2009). В целом можно предположить, что при отсутствии этих генов бактерии не способны окислять тиосульфат. Однако с учетом высокой степени родства геномов в пределах видов (ANI > 99 %) описанная мозаичная утрата отдельных генов может быть следствием неполноты сборок геномов.

Элементарная сера, являющаяся одним из продуктов функционирования Sox-системы и SQR/FCSD, у представителей рода “*Ca. Parabeggiatoa*” окисляется с

участием rDsr-комплекса. Гены rDsr-системы представлены во всех исследованных геномах “*Ca. Parabeggiatoa*”. У большинства представителей выявлен набор генов *dsrABEFHCMKLJOPNRS*, тогда как в MAG 4572\_84 гены *dsrN* и *dsrR* не обнаружены. В целом rDsr-система является одной из наиболее полно представленных систем диссимиляционного метаболизма серы в геномах “*Ca. Parabeggiatoa*” (Рисунок 32, Таблица 12).

Аннотация геномов “*Ca. Parabeggiatoa*” показала, что системы окисления сульфита характеризуются вариабельностью по составу генов. Гены *aprAB*, кодирующие APS-редуктазу непрямого пути окисления сульфита, выявлены у всех исследованных представителей рода. Ген *sat*, кодирующий АТФ-сульфурилазу, присутствует в геномах WS\_Bin1, B37\_G9, B3\_G6 и B38\_G9. Таким образом, полный набор генов *aprAB* и *sat*, потенциально обеспечивающий APS-зависимое окисление сульфита, представлен в этих четырех геномах.

Гены прямого пути окисления сульфита *soeABC*, кодирующие мембраносвязанный комплекс сульфит:хиноноксидоредуктазы SoeABC, полностью представлены в геномах WS\_Bin1, B5\_G6, B38\_G9 и 4572\_84. В остальных MAG этот комплекс представлен неполно: в B2\_G13 отсутствует ген *soeC*, а в B37\_G9 и B3\_G6 — *soeB* и *soeC*. Полные наборы генов обоих путей окисления сульфита — *soeABC* и *aprAB/sat* — одновременно выявлены в геномах WS\_Bin1 и B38\_G9 (Рисунок 32, Таблица 12).

Наличие внутриклеточных вакуолей, в которых предположительно накапливается нитрат в высоких концентрациях — до 800 мМ, характерно для морских нитчатых гигантских сероокисляющих бактерий (Otte *et al.*, 1999; Sayama, 2001; Zopfi *et al.*, 2001; McHatton *et al.*, 1996; Jørgensen *et al.*, 2010). Ранние исследования накопительных культур этих бактерий свидетельствуют о возможном участии нитрата в процессах нитратного восстановления или денитрификации, обеспечивающих окисление сульфида при низких концентрациях кислорода (Otte *et al.*, 1999; Sayama, 2001; Zopfi *et al.*, 2001; Jørgensen *et al.*, 2010).

**Таблица 12 — 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                  | Денитрификац<br>ия,<br>нитратредуктаз<br>а семейства<br>Nar                                                                        | NO <sub>3</sub> <sup>−</sup> → NO <sub>2</sub> <sup>−</sup> | narGHIJ             | narGHIJ      |                 |                | narGHIJ      | narGHIJ         |                 | −                   |                            |      |
|                                     |                                                                                                                                    | NO <sub>2</sub> <sup>−</sup> → NO                           | −                   | nirS         |                 |                | −            | nirS            |                 |                     |                            |      |
|                                     |                                                                                                                                    | NO → N <sub>2</sub> O                                       | norBC               | norBC        |                 |                | norBC        | norBC           |                 |                     |                            |      |
|                                     |                                                                                                                                    | N <sub>2</sub> O → N <sub>2</sub>                           | −                   | nosZ         |                 |                | −            | nosZ            |                 |                     |                            |      |
|                                     | Диссимиляционное<br>восстановление NO <sub>3</sub> <sup>−</sup> до NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ,<br>нитратредуктаза семейства Nar |                                                             | napAB               | nirBD        |                 |                | napAB, nirBD |                 |                 | napA,<br>nirBD      | napAB, nirBD               |      |
|                                     | Ассимиляционное<br>восстановление NO <sub>3</sub> <sup>−</sup> до NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ,<br>нитратредуктаза семейства Nas  |                                                             |                     | nasA, nirBD  |                 |                |              |                 |                 | nasA, nirBD         |                            |      |
|                                     | Фиксация молекулярного азота                                                                                                       |                                                             | −                   |              |                 |                |              |                 |                 | −                   | nifASUBXX2ENQVW<br>MHDKZTO |      |
| Диссимиляционный<br>метаболизм серы | Системы окисления<br>сероводорода                                                                                                  |                                                             | sqrAF,<br>fccAB     | sqrAF, fccAB | sqrAF,<br>fccAB | sqrA,<br>fccAB | fccAB        | sqrAF,<br>fccAB | sqrAF,<br>fccAB | sqrF,<br>fccAB      |                            |      |
|                                     | Окисление тиосульфата, Sox-<br>система                                                                                             |                                                             | soxAXBYZ            | soxAXBYZ     | soxAXYZ         | soxAXBYZ       | soxAXBY      | soxAXBYZ        | soxBYZ          | soxAXBYZ            |                            |      |
|                                     | Система окисления элементной<br>серы, rDSR-система                                                                                 |                                                             | dsrABEFHCMKLJOPNRS  |              |                 |                |              |                 |                 |                     |                            |      |
|                                     | Системы<br>окисления<br>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<br>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:хинооксидоредуктазы; *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 АТФ-сульфуриказы. “*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 *et al.*, 2024).

Анализ геномов представителей рода “*Ca. Parabeggiatoa*” выявил гены различных путей диссимиляционного восстановления нитрата, набор которых различался между исследованными геномами. Полный набор генов денитрификации — *narGHIJ*, *nirS*, *norBC* и *nosZ* — присутствует в геномах представителей “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. nov. 2 и “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. nov. 3. Геномы B3\_G6 и “*Ca. Parabeggiatoa communis*” WS\_Bin1 не содержат гена *nirS*, кодирующего нитритредуктазу, которая катализирует превращение  $\text{NO}_2^-$  в  $\text{NO}$ , а также гена *nosZ*, кодирующего редуктазу закиси азота, участвующую в восстановлении  $\text{N}_2\text{O}$  до  $\text{N}_2$ .

Наряду с денитрификацией, у ряда представителей рода выявлен генетический потенциал диссимиляционного восстановления нитрата до аммония. Гены *napAB*, кодирующие субъединицы периплазматической нитратредуктазы NapAB, осуществляющей восстановление нитрата до нитрита, и *nirBD*, кодирующие субъединицы NADH-зависимой нитритредуктазы NirBD, восстанавливающей нитрит до аммония, выявлены в геномах представителей “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. nov. 1 и “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. nov. 2. Совместное присутствие этих генов указывает на потенциальную способность к диссимиляционному восстановлению нитрата до аммония (Huang *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2026; Cruz-García *et al.*, 2007). У “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. nov. 3 гены *napAB* отсутствуют, однако сочетание *narGHIJ* и *nirBD* указывает на потенциальную возможность диссимиляционного восстановления нитрата до аммония. В геноме “*Ca. Parabeggiatoa communis*” WS\_Bin1, напротив, выявлены гены *napAB*, но отсутствуют *nirBD*.

В геномах представителей “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. nov. 1, “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. nov. 2 и “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. nov. 3 выявлен ген *nasA*, кодирующий ассимиляционную нитратредуктазу, осуществляющую восстановление нитрата до нитрита. Наличие *nasA* наряду с генами *nirBD* указывает на потенциальную способность этих представителей к ассимиляционному восстановлению нитрата до аммония. В геноме “*Ca. Parabeggiatoa communis*” WS\_Bin1 ген *nasA* не обнаружен.

Гены фиксации молекулярного азота, представленные кластером *nif*, отсутствуют у всех представителей рода “*Ca. Parabeggiatoa*” (Рисунок 32, Таблица 12).

У представителей рода “*Ca. Parabeggiatoa*” выявлены все гены цикла Кальвина–Бенсона–Бэссема, включая гены ключевых ферментов Рубиско и фосфорибулокиназы. Гены Рубиско типа II присутствуют в геномах “*Ca. Parabeggiatoa communis*” WS\_Bin1 и представителей “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. nov. 3. Рубиско типа IAq кодируется в геномах представителей “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. nov. 1 и “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. nov. 2. Таким образом, наличие ряда систем диссимиляционного метаболизма серы и генов цикла Кальвина–Бенсона–Бэссема указывает на потенциальную способность представителей рода “*Ca. Parabeggiatoa*” к литоавтотрофии (Таблица 12).

Центральный метаболизм углерода у представителей “*Ca. Parabeggiatoa*” включает гликолиз и цикл Кребса. Во всех исследованных геномах выявлен ген *gpmA*, кодирующий 2,3-бисфосфоглицерат-зависимую фосфоглицератмутазу, тогда как ген *glk*, кодирующий глюкокиназу, не обнаружен у представителей “*Ca. Parabeggiatoa*” sp. nov. 2. Гены ферментов цикла Кребса представлены во всех исследованных геномах. В то же время гены ключевых ферментов глиоксилатного цикла — изоцитратлиазы (*aceA*) и малатсинтазы (*aceB*) — отсутствуют.

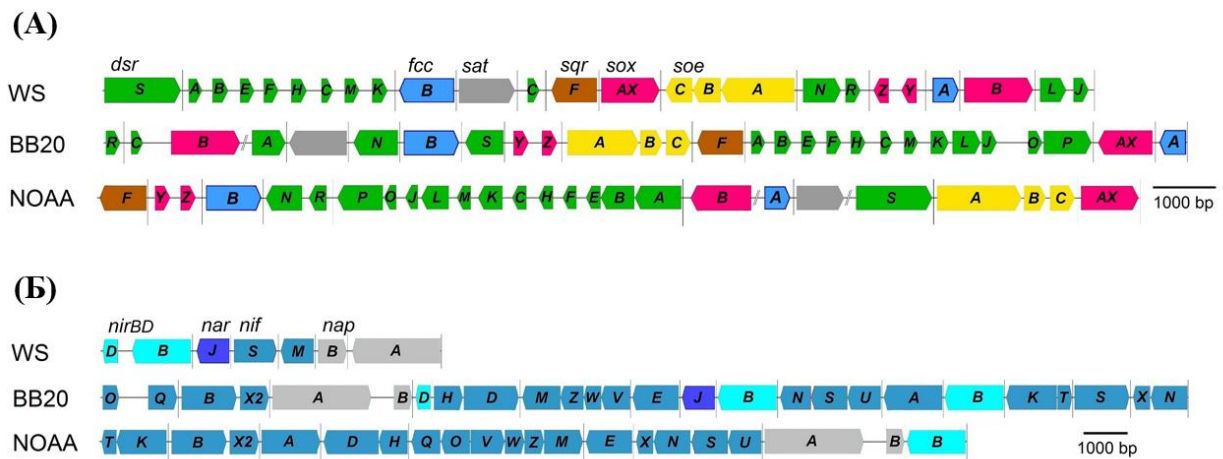
В геномах “*Ca. Parabeggiatoa*” не выявлены гены, обеспечивающие метилотрофный рост, в частности гены метанолдегидрогеназы и циклов ассимиляции одноуглеродных соединений — рибулозомонофосфатного и серинового циклов. Способность к метилотрофному росту ранее была показана для представителей близкородственного рода *Beggiatoa* (Jewell *et al.*, 2008; Orlova *et al.*, 2018).

Аннотация генов основных метаболических путей представителей рода “*Ca. Parabeggiatoa*” представлена в Таблице А.1 Приложения.

### 3.3.7 Геномный анализ основных метаболических путей представителей нового рода “*Ca. Albibeggiatoa*”

Анализ геномов представителей нового рода “*Ca. Albibeggiatoa*” выявил ряд генов, связанных с диссимиляционным метаболизмом серы и характерных для представителей семейства *Beggiatoaceae*. Геномы “*Ca. Albibeggiatoa psychrophila*” sp. nov. WS, “*Ca. Albibeggiatoa*” sp. nov. BB20 и “*Ca. Albibeggiatoa*” sp. nov. NOAA содержат ген *sqrF*, кодирующий SQR типа VI, и гены *fccAB*, кодирующие FCSD, которые обеспечивают окисление сероводорода до

элементной серы. Гены *rDsr*-системы выявлены во всех трех геномах; в MAG BB20 и NOAA представлен набор *dsrABEFHCMKLJOPNRS*, тогда как в MAG WS гены *dsrO* и *dsrP* не обнаружены. Гены *soeABC*, кодирующие мембраносвязанный комплекс цитоплазматической сульфит:хиноноксидоредуктазы *SoeABC*, осуществляющей прямое окисление сульфита до сульфата, выявлены во всех трех геномах. Тиосульфат окисляется разветвленной *Sox*-системой, гены которой присутствуют в геномах всех трех видов. Как и у представителей рода “*Ca. Parabeggiatoa*”, в геномах “*Ca. Albibeggiatoa*” выявлены гены, кодирующие гибридный белок *SoxAX*. Гены *aprAB*, кодирующие APS-редуктазу непрямого пути окисления сульфита, выявлены не были, однако присутствует ген *sat*, кодирующий АТР-сульфурилазу, которая, вероятнее всего, участвует в ассимиляционном восстановлении сульфата (Рисунок 33, Таблица 12).



**Рисунок 33 — Расположение генов, кодирующих ферменты диссимиляционного метаболизма серы и азота, а также фиксации молекулярного азота у представителей рода “*Ca. Albibeggiatoa*”**

WS — “*Ca. Albibeggiatoa psychrophila*”; BB20 — “*Ca. Albibeggiatoa*” sp.; NOAA — “*Ca. Albibeggiatoa*” sp. *narG* — ген мембраносвязанной нитратредуктазы; *nirS* — ген диссимиляционной нитритредуктазы; *napAB* — гены периплазматической нитратредуктазы; *nirBD* — гены NADH-зависимой нитритредуктазы *NirBD*; 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; *sat* — ген АТР-сульфурилазы. Для обозначения генных систем с одинаковыми названиями использованы те же цвета, что и на рисунке 32. Цветовая палитра приведена в подписи к рисунку 32 (цит. по Ravin *et al.*, 2024).

Метаболизм азота у исследованных геномов был представлен ассимиляционными и потенциально диссимиляционными путями восстановления

нитрата. В геномах BB20 и NOAA выявлено сочетание генов *napAB* и *nirBD*, указывающее на вероятную способность к диссимиляционному восстановлению нитрата до аммония. В MAG WS выявлены *napA* и *nirBD*, тогда как ген *napB* не обнаружен.

В геномах BB20 и NOAA выявлен ген *nasA*, кодирующий ассимиляционную нитратредуктазу, осуществляющую восстановление нитрата до нитрита. Наличие *nasA* наряду с генами *nirBD* указывает на потенциальную способность этих представителей к ассимиляционному восстановлению нитрата до аммония. В MAG WS ген *nasA* представлен двумя фрагментами, расположенными на разных контигах, тогда как гены *nirBD* также присутствуют. В исследованных геномах также аннотированы гены *glnB*, *gltBD* и *aspB*, связанные с ассимиляцией аммония, при этом ген *aspB* в геноме WS не выявлен (Рисунок 33, Таблица 12).

В MAG BB20 и NOAA выявлен полный набор генов *nif*, включающий структурные гены нитрогеназы *nifHDK*, а также гены, связанные с регуляцией, сборкой и созреванием нитрогеназного комплекса. В MAG WS полного набора генов, необходимого для фиксации молекулярного азота, не обнаружено.

Автотрофная ассимиляция диоксида углерода осуществляется посредством цикла Кальвина–Бенсона–Бэссема. В геномах представителей “*Ca. Albibeggiatoa*” выявлены гены Рубиско типа II (Таблица 12). Ген фосфорибулокиназы *prk* выявлен в геномах BB20 и NOAA, тогда как в геноме WS он не обнаружен.

В геномах присутствуют все гены цикла Кребса, окислительного пентозофосфатного пути и глиоксилатного шунта. Наличие полного набора генов, кодирующих компоненты электрон-транспортной цепи, указывает на дыхательный тип метаболизма.

Как и у представителей рода “*Ca. Parabeggiatoa*”, в геномах “*Ca. Albibeggiatoa*” не выявлены гены, обеспечивающие метилотрофный рост.

Аннотация генов основных метаболических путей представителей рода “*Ca. Albibeggiatoa*” представлена в Таблице A.1 Приложения.

## 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. leptomitiformis*, 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. leptomitiformis* 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. leptomitiformis* D-402. Впервые для *B. leptomitiformis* показано, что превращение внутриклеточной элементной серы протекает при участии персульфиддиоксигеназы, тогда как гены известных систем ее окисления rDsr и sHdr, серооксигеназы/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. leptomitiformis* 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 рода «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. leptomitiformis* D-401 и D-402<sup>T</sup> 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. leptomitiformis* 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. leptomitiformis* выявлена и охарактеризована персульфиддиоксигеназа, участвующая в превращении внутриклеточной элементной серы с образованием сульфита. Установлено, что персульфиддиоксигеназа *B. leptomitiformis* относится к PDO I типа и катализирует кислородзависимое окисление глутатионперсульфида с удельной активностью около 2900 U·мг<sup>-1</sup>. 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. leptomitiformis* 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 сокращений

- AAI — средняя аминокислотная идентичность (англ. average amino acid identity)
- ANI — средняя нуклеотидная идентичность (англ. average nucleotide identity)
- APS — аденозин-5'-фосфосульфат
- DNRA — диссимиляционное восстановление нитрата до аммония (англ. dissimilatory nitrate reduction to ammonium)
- FCSD — флавоцитохром-с-сульфиддегидрогеназа
- GSH — восстановленный глутатион
- GSSH — глутатионперсульфид
- GTDB — база данных геномной таксономии (англ. Genome Taxonomy Database)
- ICNP — Международный кодекс номенклатуры прокариот (англ. International Code of Nomenclature of Prokaryotes)
- LPSN — список названий прокариот, имеющих номенклатурный статус (англ. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature)
- MAG — геном, собранный из метагенома (англ. metagenome-assembled genome)
- MALDI-TOF/TOF-MS — матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетной тандемной масс-спектрометрией
- PDB — банк данных белковых структур (англ. Protein Data Bank)
- PDO — персульфиддиоксигеназа
- rDSR — обратная диссимиляционная сульфитредуктаза
- RMSD — среднеквадратичное отклонение
- SAG — амплифицированный геном отдельной клетки (англ. single-amplified genome)
- SDO — диоксигеназа серы (англ. sulfur dioxygenase)
- Sgp — белок серной глобулы (англ. sulfur globule protein)
- sHdr — сероокисляющий Hdr-подобный гетеродисульфидредуктазный комплекс
- SOR — серооксигеназа/редуктаза
- SQR — сульфид:хиноноксидоредуктаза
- ВЭЖХ-МС/МС — высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией

### Список литературы

1. Ahmad A., Kalanetra K.M., Nelson D.C. Cultivated *Beggiatoa* spp. define the phylogenetic root of morphologically diverse, noncultured, vacuolate sulfur bacteria // Canadian Journal of Microbiology. — 2006. — V. 52, № 6. — P. 591–598.
2. Ahmad A., Barry J.P., Nelson D.C. Phylogenetic affinity of a wide, vacuolate, nitrate-accumulating *Beggiatoa* sp. from Monterey Canyon, California, with *Thioploca* spp. // Applied and Environmental Microbiology. — 1999. — V. 65, № 1. — P. 270–277.
3. Alneberg J., Bjarnason B.S., de Bruijn I., Schirmer M., Quick J., Ijaz U.Z., Lahti L., Loman N.J., Andersson A.F., Quince C. Binning metagenomic contigs by coverage and composition // Nature Methods. — 2014. — V. 11, № 11. — P. 1144–1146.
4. American Public Health Association; American Water Works Association; Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. — 21st ed. — Washington, DC: American Public Health Association, 2005. — 1288 p. — ISBN 978-0-87553-047-5.
5. Anselm V., Novikova S., Zgoda V. Re-adaption on earth after spaceflights affects the mouse liver proteome // International Journal of Molecular Sciences. — 2017. — V. 18, № 8. — Art. 1763.
6. Aranda C.P., Buschmann A.H., Bisquertt A., Vega D., González A.R., Quiroz M. Shifts in prokaryotic communities and giant sulphur-oxidising bacteria in response to salmon aquaculture in sub-Antarctic marine sediments // Marine Pollution Bulletin. — 2026. — V. 222, Pt. 2. — Art. 118694.
7. Arce-Rodríguez A., Puente-Sánchez F., Avendaño R., Martínez-Cruz M., de Moor J.M., Pieper D.H., Chavarría M. *Thermoplasmatales* and sulfur-oxidizing bacteria dominate the microbial community at the surface water of a CO<sub>2</sub>-rich hydrothermal spring located in Tenorio Volcano National Park, Costa Rica // Extremophiles. — 2019. — V. 23, № 2. — P. 177–187.
8. Bailey J.V., Flood B.E., Ricci E., Delherbe N. Imaging of cellular oxidoreductase activity suggests mixotrophic metabolisms in *Thiomargarita* spp. // mBio. — 2017. — V. 8, № 6. — Art. e01263-17.
9. Barsnes H., Vaudel M. SearchGUI: a highly adaptable common interface for proteomics search and de novo engines // Journal of Proteome Research. — 2018. — V. 17, № 7. — P. 2552-2555.
10. Berg J.S., Schwedt A., Kreutzmann A.-C., Kuypers M.M.M., Milucka J. Polysulfides as intermediates in the oxidation of sulfide to sulfate by *Beggiatoa* spp. // Applied and Environmental Microbiology. — 2014. — V. 80, № 2. — P. 629–636.
11. Beutler M., Milucka J., Hinck S., Schreiber F., Brock J., Mußmann M., Schulz-Vogt H.N., de Beer D. Vacuolar respiration of nitrate coupled to energy conservation in filamentous *Beggiatoaceae* // Environmental Microbiology. — 2012. — V. 14, № 11. — P. 2911–2919.
12. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. — 2014. — V. 30, № 15. — P. 2114–2120.

13. Brettin T., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Olsen G.J., Olson R., Overbeek R., Parrello B., Pusch G.D., Shukla M., Thomason J.A. III, Stevens R., Vonstein V., Wattam A.R., Xia F. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes // *Scientific Reports*. — 2015. — V. 5. — Art. 8365.
14. Brune D.C. Isolation and characterization of sulfur globule proteins from *Chromatium vinosum* and *Thiocapsa roseopersicina* // *Archives of Microbiology*. — 1995. — V. 163, № 6. — P. 391–399.
15. Buchanan R.E. Order VII. *Beggiatoales* Buchanan, Ordo Nov. // *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* / Breed R.S. et al. — 7th ed. — Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1957. — P. 837–853.
16. Chan L.K., Weber T.S., Morgan-Kiss R.M., Hanson T.E. A genomic region required for phototrophic thiosulfate oxidation in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* (syn. *Chlorobaculum tepidum*) // *Microbiology*. — 2008. — V. 154, № 3. — P. 818–829.
17. Chaumeil P.-A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database // *Bioinformatics*. — 2019. — V. 36, № 6. — P. 1925–1927.
18. Chernitsyna S.M., Bukin S.V., Zemskaya T.I. Genomic analysis of the colorless sulfur bacterium *Thioploca* sp. and its microbial communities from Lake Baikal // *Journal of Great Lakes Research*. — 2026. — Art. 102865.
19. Chernitsyna S.M., Khal'zov I.A., Khanaeva T.A., Morozov I.V., Klimenkov I.V., Pimenov N.V., Zemskaya T.I. Microbial community associated with *Thioploca* sp. sheaths in the area of the Posolsk Bank methane seep, southern Baikal // *Microbiology*. — 2016. — V. 85, № 5. — P. 562–569.
20. Chklovski A., Parks D.H., Woodcroft B.J., Tyson G.W. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning // *Nature Methods*. — 2023. — V. 20, № 8. — P. 1203–1212.
21. Chuang P.-C., Anderson C.H., Kossack M., Fabian J., Su C.-C., Vosteen P., Zabel M., Scholz F., Schulz-Vogt H.N., Sommer S., Dale A.W. Nutrient turnover by large sulfur bacteria on the Namibian mud belt during the low productivity season // *Frontiers in Marine Science*. — 2022. — V. 9. — Art. 929913.
22. Cox J., Mann M. Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology // *Annual Review of Biochemistry*. — 2011. — V. 80. — P. 273–299.
23. Cruz-García C., Murray A.E., Klappenbach J.A., Stewart V., Tiedje J.M. Respiratory nitrate ammonification by *Shewanella oneidensis* MR-1 // *Journal of Bacteriology*. — 2007. — V. 189, № 2. — P. 656–662.
24. Dahl C. A biochemical view on the biological sulfur cycle // *Environmental technologies to treat sulfur pollution: principles and engineering* / Lens P.N.L. — 2nd ed. — London: IWA Publishing, 2020. — P. 55–96.

25. Dahl C., Prange A. Bacterial sulfur globules: occurrence, structure and metabolism // Inclusions in Prokaryotes / Shively J.M. — Berlin; Heidelberg: Springer, 2006. — P. 21–51.
26. Dahl C. Sulfur metabolism in phototrophic bacteria // Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes / Hallenbeck P.C. — Cham: Springer, 2017. — P. 27–66.
27. Dahl C., Franz B., Hensen D., Kesselheim A., Zigann R. Sulfite oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: identification of SoeABC as a major player and relevance of SoxYZ in the process // Microbiology. — 2013. — V. 159, № 12. — P. 2626–2638.
28. Danovaro R., Canals M., Tangherlini M., Dell'Anno A., Gambi C., Lastras G., Amblas D., Sanchez-Vidal A., Frigola J., Calafat A.M., Pedrosa-Pàmies R., Rivera J., Rayo X., Corinaldesi C. A submarine volcanic eruption leads to a novel microbial habitat // Nature Ecology & Evolution. — 2017. — V. 1, № 6. — Art. 144.
29. Diao M., Huisman J., Muyzer G. Spatio-temporal dynamics of sulfur bacteria during oxic–anoxic regime shifts in a seasonally stratified lake // FEMS Microbiology Ecology. — 2018. — V. 94, № 4. — Art. fiy040.
30. Dombrowski N., Teske A.P., Baker B.J. Expansive microbial metabolic versatility and biodiversity in dynamic Guaymas Basin hydrothermal sediments // Nature Communications. — 2018. — V. 9, № 1. — Art. 4999.
31. Dombrowski N., Seitz K.W., Teske A.P., Baker B.J. Genomic insights into potential interdependencies in microbial hydrocarbon and nutrient cycling in hydrothermal sediments // Microbiome. — 2017. — V. 5, № 1. — Art. 106.
32. Dubinina G., Savvichev A., Orlova M., Gavrish E., Verbarq S., Grabovich M. *Beggiatoa leptomitiformis* sp. nov., the first freshwater member of the genus capable of chemolithoautotrophic growth // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. — 2017. — V. 67, № 2. — P. 197–204.
33. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. Features and development of Coot // Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. — 2010. — V. 66, № 4. — P. 486–501.
34. Ferdelman T.G., Lee C., Pantoja S., Harder J., Bebout B.M., Fossing H. Sulfate reduction and methanogenesis in a *Thioploca*-dominated sediment off the coast of Chile // Geochimica et Cosmochimica Acta. — 1997. — V. 61, № 15. — P. 3065–3079.
35. Fisunov G.Y., Alexeev D.G., Bazaleev N.A., Ladygina V.G., Galyamina M.A., Kondratov I.G., Zhukova N.A., Serebryakova M.V., Demina I.A., Govorun V.M. Core proteome of the minimal cell: comparative proteomics of three mollicute species // PLOS ONE. — 2011. — V. 6, № 7. — Art. e21964.
36. Flood B.E., Louw D.C., Van der Plas A.K., Bailey J.V. Giant sulfur bacteria (*Beggiatoaceae*) from sediments underlying the Benguela upwelling system host diverse microbiomes // PLOS ONE. — 2021. — V. 16, № 11. — Art. e0258124.
37. Flood B.E., Fliss P., Jones D.S., Dick G.J., Jain S., Kaster A.-K., Winkel M., Mußmann M., Bailey J.V. Single-cell (meta-)genomics of a dimorphic *Candidatus* Thiomargarita

- nelsonii reveals genomic plasticity // *Frontiers in Microbiology*. — 2016. — V. 7. — Art. 603.
38. Fomenkov A., Sun Z., Vincze T., Dubinina G., Orlova M., Tarlachkov S.V., Anton B.P., Grabovich M.Y., Roberts R.J. Complete genome sequence of the freshwater bacterium *Beggiatoa leptomitiformis* strain D-401 // *Genome Announcements*. — 2018. — V. 6, № 17. — Art. e00311-18.
  39. Fomenkov A., Vincze T., Grabovich M.Y., Dubinina G., Orlova M., Belousova E., Roberts R.J. Complete genome sequence of the freshwater colorless sulfur bacterium *Beggiatoa leptomitiformis* neotype strain D-402<sup>T</sup> // *Genome Announcements*. — 2015. — V. 3, № 6. — Art. e01436-15.
  40. Fonseca A., Ishoey T., Espinoza C., Pérez-Pantoja D., Manghisi A., Morabito M., Salas-Burgos A., Gallardo V.A. Genomic features of “*Candidatus Venteria ishoeyi*”, a new sulfur-oxidizing macrobacterium from the Humboldt Sulfuretum off Chile // *PLOS ONE*. — 2017. — V. 12, № 12. — Art. e0188371.
  41. Fonseca A., Ishoey T., Espinoza C., Marshall I.P.G., Nielsen L.P., Gallardo V.A. Large filamentous bacteria isolated from sulphidic sediments reveal novel species and distinct energy and defence mechanisms for survival // *Environmental Microbiology*. — 2025. — V. 27, № 3. — Art. e70083.
  42. Fossing H., Gallardo V.A., Jørgensen B.B., Hüttel M., Nielsen L.P., Schulz H., Canfield D.E., Forster S., Glud R.N., Gundersen J.K., Küver J., Ramsing N.B., Teske A., Thamdrup B., Ulloa O. Concentration and transport of nitrate by the mat-forming sulphur bacterium *Thioploca* // *Nature*. — 1995. — V. 374, № 6524. — P. 713–715.
  43. Friedrich C.G., Rother D., Bardischewsky F., Quentmeier A., Fischer J. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2001. — V. 67, № 7. — P. 2873–2882.
  44. Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T. Order V. *Thiotrichales* ord. nov. // *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology* / Brenner D.J. et al. — 2nd ed. — New York: Springer, 2005. — V. 2B. — P. 131–210.
  45. Giordano F., Troilo F., Nastasi M.R., Caruso L., Mellini M., Travaglini-Allocatelli C., Giardina G., Vicente J.B., Rampioni G., Di Matteo A., Forte E., Giuffrè A. Structure and function of persulfide dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*: implications on H<sub>2</sub>S homeostasis and interplay with nitric oxide // *iScience*. — 2026. — V. 29, № 2. — Art. 114586.
  46. Goudarzi S., Babicz J.T. Jr., Kabil O., Banerjee R., Solomon E.I. Spectroscopic and electronic structure study of ETHE1: elucidating the factors influencing sulfur oxidation and oxygenation in mononuclear nonheme iron enzymes // *Journal of the American Chemical Society*. — 2018. — V. 140, № 44. — P. 14887–14902.
  47. Grabarczyk D.B., Berks B.C. Intermediates in the Sox sulfur oxidation pathway are bound to a sulfane conjugate of the carrier protein SoxYZ // *PLOS ONE*. — 2017. — V. 12, № 3. — Art. e0173395.
  48. Grabovich M.Y., Patrinskaya V.Y., Muntyan M.S., Dubinina G.A. Lithoautotrophic growth of the freshwater strain *Beggiatoa* D-402 and energy conservation in a

- homogeneous culture under microoxic conditions // FEMS Microbiology Letters. — 2001. — V. 204, № 2. — P. 341–345.
49. Grünke S., Lichtschlag A., de Beer D., Felden J., Salman V., Ramette A., Schulz-Vogt H.N., Boetius A. Mats of psychrophilic thiotrophic bacteria associated with cold seeps of the Barents Sea // Biogeosciences. — 2012. — V. 9, № 8. — P. 2947–2960.
  50. Guindon S., Dufayard J.-F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 // Systematic Biology. — 2010. — V. 59, № 3. — P. 307–321.
  51. Gureeva M.V., Grabovich M.Y. *Thioflexithrix* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Trujillo M.E. et al. — Hoboken: John Wiley & Sons, 2021. — P. 1–8.
  52. Gureeva M.V., Belousova E.V., Dubinina G.A., Novikov A.A., Kopitsyn D.S., Grabovich M.Y. *Thioflexithrix pseupsensis* gen. nov., sp. nov., a filamentous gliding sulfur bacterium from the family *Beggiatoaceae* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. — 2019. — V. 69, № 3. — P. 798–804.
  53. Gómez E., Romero L., Quipúzcoa L., Pacheco A.S. Macrobenthic community structure and diversity across a bathymetric gradient within and below the oxygen minimum zone in central Peru // Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers. — 2024. — V. 209. — Art. 104341.
  54. Güde H., Strohl W.R., Larkin J.M. Mixotrophic and heterotrophic growth of *Beggiatoa alba* in continuous culture // Archives of Microbiology. — 1981. — V. 129, № 5. — P. 357–360.
  55. Hagen K.D., Nelson D.C. Organic carbon utilization by obligately and facultatively autotrophic *Beggiatoa* strains in homogeneous and gradient cultures // Applied and Environmental Microbiology. — 1996. — V. 62, № 3. — P. 947–953.
  56. Hagen K.D., Nelson D.C. Use of reduced sulfur compounds by *Beggiatoa* spp.: enzymology and physiology of marine and freshwater strains in homogeneous and gradient cultures // Applied and Environmental Microbiology. — 1997. — V. 63, № 10. — P. 3957–3964.
  57. Hedlund B.P., Chuvochina M., Hugenholtz P., Konstantinidis K.T., Murray A.E., Palmer M., Parks D.H., Probst A.J., Reysenbach A.-L., Rodriguez-R L.M., Rosselló-Móra R., Sutcliffe I.C., Venter S.N., Whitman W.B. SeqCode: a nomenclatural code for prokaryotes described from sequence data // Nature Microbiology. — 2022. — V. 7, № 10. — P. 1702–1708.
  58. Hensen D., Sperling D., Trüper H.G., Brune D.C., Dahl C. Thiosulphate oxidation in the phototrophic sulphur bacterium *Allochromatium vinosum* // Molecular Microbiology. — 2006. — V. 62, № 3. — P. 794–810.
  59. Hinck S., Neu T.R., Lavik G., Mußmann M., de Beer D., Jonkers H.M. Physiological adaptation of a nitrate-storing *Beggiatoa* sp. to diel cycling in a phototrophic hypersaline mat // Applied and Environmental Microbiology. — 2007. — V. 73, № 21. — P. 7013–7022.

60. Hinck S., Mußmann M., Salman V., Neu T.R., Lenk S., de Beer D., Jonkers H.M. Vacuolated *Beggiatoa*-like filaments from different hypersaline environments form a novel genus // *Environmental Microbiology*. — 2011. — V. 13, № 12. — P. 3194–3205.
61. Holkenbrink C., Ocón Barbas S., Møllerup A., Otaki H., Frigaard N.-U. Sulfur globule oxidation in green sulfur bacteria is dependent on the dissimilatory sulfite reductase system // *Microbiology*. — 2011. — V. 157, № 4. — P. 1229–1239.
62. Hou N., Xia Y., Wang X., Liu H., Liu H., Xun L. H<sub>2</sub>S biotreatment with sulfide-oxidizing heterotrophic bacteria // *Biodegradation*. — 2018. — V. 29, № 6. — P. 511–524.
63. Huang X., Weisener C.G., Ni J., He B., Xie D., Li Z. Nitrate assimilation, dissimilatory nitrate reduction to ammonium, and denitrification coexist in *Pseudomonas putida* Y-9 under aerobic conditions // *Bioresource Technology*. — 2020. — V. 312. — Art. 123597.
64. Huettel M., Forster S., Klöser S., Fossing H. Vertical migration in the sediment-dwelling sulfur bacteria *Thioploca* spp. in overcoming diffusion limitations // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1996. — V. 62, № 6. — P. 1863–1872.
65. Imhoff J.F., Kyndt J.A., Meyer T.E. Genomic comparison, phylogeny and taxonomic reevaluation of the *Ectothiorhodospiraceae* and description of *Halorhodospiraceae* fam. nov. and *Halochlorospira* gen. nov. // *Microorganisms*. — 2022. — V. 10, № 2. — Art. 295.
66. Jackson M.R., Melideo S.L., Jorns M.S. Human sulfide:quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite // *Biochemistry*. — 2012. — V. 51, № 34. — P. 6804–6815.
67. Jewell T., Huston S.L., Nelson D.C. Methylophily in freshwater *Beggiatoa alba* strains // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2008. — V. 74, № 17. — P. 5575–5578.
68. Jones D.S., Flood B.E., Bailey J.V. Metatranscriptomic analysis of diminutive *Thiomargarita*-like bacteria ("*Candidatus* Thiopilula" spp.) from abyssal cold seeps of the Barbados Accretionary Prism // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2015. — V. 81, № 9. — P. 3142–3156.
69. Jørgensen B.B., Dunker R., Grünke S., Røy H. Filamentous sulfur bacteria, *Beggiatoa* spp., in arctic marine sediments (Svalbard, 79 degrees N) // *FEMS Microbiology Ecology*. — 2010. — V. 73, № 3. — P. 500–513.
70. Jørgensen B.B., Findlay A.J., Pellerin A. The biogeochemical sulfur cycle of marine sediments // *Frontiers in Microbiology*. — 2019. — V. 10. — Art. 849.
71. Kabil O., Banerjee R. Characterization of patient mutations in human persulfide dioxygenase (ETHE1) involved in H<sub>2</sub>S catabolism // *Journal of Biological Chemistry*. — 2012. — V. 287, № 53. — P. 44561–44567.
72. Kabsch W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. — 2010. — V. 66, № 2. — P. 133–144.

73. Kalanetra K.M., Huston S.L., Nelson D.C. Novel, attached, sulfur-oxidizing bacteria at shallow hydrothermal vents possess vacuoles not involved in respiratory nitrate accumulation // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2004. — V. 70, № 12. — P. 7487–7496.
74. Kamp A., Stief P., Schulz-Vogt H.N. Anaerobic sulfide oxidation with nitrate by a freshwater *Beggiatoa* enrichment culture // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2006. — V. 72, № 7. — P. 4755–4760.
75. Kang D.D., Li F., Kirton E., Thomas A., Egan R., An H., Wang Z. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies // *PeerJ*. — 2019. — V. 7. — Art. e7359.
76. Kappler U., Maher M.J. The bacterial SoxAX cytochromes // *Cellular and Molecular Life Sciences*. — 2013. — V. 70, № 6. — P. 977–992.
77. Kojima H., Ogura Y., Yamamoto N., Togashi T., Mori H., Watanabe T., Nemoto F., Kurokawa K., Hayashi T., Fukui M. Ecophysiology of *Thioploca ingrica* as revealed by the complete genome sequence supplemented with proteomic evidence // *The ISME Journal*. — 2015. — V. 9, № 5. — P. 1166–1176.
78. Kojima H., Teske A., Fukui M. Morphological and phylogenetic characterizations of freshwater *Thioploca* species from Lake Biwa, Japan, and Lake Constance, Germany // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2003. — V. 69, № 1. — P. 390–398.
79. Konstantinidis K.T., Rosselló-Móra R., Amann R. Uncultivated microbes in need of their own taxonomy // *The ISME Journal*. — 2017. — V. 11, № 11. — P. 2399–2406.
80. Kreutzmann A.-C. Electron donors and acceptors for members of the family *Beggiatoaceae*: PhD thesis / University of Bremen. — Bremen, 2013.
81. Kreutzmann A.-C., Schulz-Vogt H.N. Oxidation of molecular hydrogen by a chemolithoautotrophic *Beggiatoa* strain // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2016. — V. 82, № 8. — P. 2527–2536.
82. Kämpel C., Grein F., Dahl C. Fluorescence microscopy study of the intracellular sulfur globule protein SgpD in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* // *Microorganisms*. — 2023. — V. 11, № 7. — Art. 1792.
83. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. — 1970. — V. 227, № 5259. — P. 680–685.
84. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // *Nature Methods*. — 2012. — V. 9, № 4. — P. 357–359.
85. Larkin J.M., Henk M.C. Filamentous sulfide-oxidizing bacteria at hydrocarbon seeps of the Gulf of Mexico // *Microscopy Research and Technique*. — 1996. — V. 33, № 1. — P. 23–31.
86. Lawry N.H., Jani V., Jensen T.E. Identification of the sulfur inclusion body in *Beggiatoa alba* B18LD by energy-dispersive X-ray microanalysis // *Current Microbiology*. — 1981. — V. 6, № 2. — P. 71–74.
87. Lee I., Kim Y.O., Park S.C., Chun J. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. — 2016. — V. 66, № 2. — P. 1100–1103.

88. Li D., Liu C.M., Luo R., Sadakane K., Lam T.W. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph // *Bioinformatics*. — 2015. — V. 31, № 10. — P. 1674–1676.
89. Liebschner D., Afonine P.V., Baker M.L., Bunkóczi G., Chen V.B., Croll T.I., Hintze B., Hung L.-W., Jain S., McCoy A.J., Moriarty N.W., Oeffner R.D., Poon B.K., Prisant M.G., Read R.J., Richardson J.S., Richardson D.C., Sammito M.D., Sobolev O.V., Stockwell D.H., Terwilliger T.C., Urzhumtsev A.G., Videau L.L., Williams C.J., Adams P.D. Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix // *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*. — 2019. — V. 75, № 10. — P. 861–877.
90. Liu H., Xin Y., Xun L. Distribution, diversity, and activities of sulfur dioxygenases in heterotrophic bacteria // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2014. — V. 80, № 5. — P. 1799–1806.
91. Luo L., Luo Y., Huang X., Li Z. The *nirB* and *nirD* genes are essential for both assimilatory and dissimilatory reduction of nitrite in *Pseudomonas putida* Y-9 under aerobic conditions // *Bioresource Technology*. — 2026. — V. 453. — Art. 134621.
92. MacGregor B.J., Biddle J.F., Harbort C., Matthyse A.G., Teske A. Sulfide oxidation, nitrate respiration, carbon acquisition, and electron transport pathways suggested by the draft genome of a single orange Guaymas Basin *Beggiatoa* (*Cand. Maribeggiatoa*) sp. filament // *Marine Genomics*. — 2013a. — V. 11. — P. 53–65.
93. MacGregor B.J., Biddle J.F., Siebert J.R., Staunton E., Hegg E.L., Matthyse A.G., Teske A. Why orange Guaymas Basin *Beggiatoa* spp. are orange: single-filament-genome-enabled identification of an abundant octaheme cytochrome with hydroxylamine oxidase, hydrazine oxidase, and nitrite reductase activities // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2013b. — V. 79, № 4. — P. 1183–1190.
94. Maier S. Description of *Thioploca ingraca* sp. nov., nom. rev. // *International Journal of Systematic Bacteriology*. — 1984. — V. 34, № 3. — P. 344–345.
95. Maier S., Gallardo V.A. *Thioploca araucae* sp. nov. and *Thioploca chileae* sp. nov. // *International Journal of Systematic Bacteriology*. — 1984. — V. 34, № 4. — P. 414–418.
96. Maki J.S. Bacterial intracellular sulfur globules: structure and function // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. — 2013. — V. 23, № 4-5. — P. 270–280.
97. McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D., Winn M.D., Storoni L.C., Read R.J. Phaser crystallographic software // *Journal of Applied Crystallography*. — 2007. — V. 40, № 4. — P. 658–674.
98. McCoy J.G., Bingman C.A., Bitto E., Holdorf M.M., Makaroff C.A., Phillips G.N. Jr. Structure of an ETHE1-like protein from *Arabidopsis thaliana* // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. — 2006. — V. 62, № 9. — P. 964–970.
99. McHatton S.C., Barry J.P., Jannasch H.W., Nelson D.C. High nitrate concentrations in vacuolate, autotrophic marine *Beggiatoa* spp. // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1996. — V. 62, № 3. — P. 954–958.

100. Mezzino M.J., Strohl W.R., Larkin J.M. Characterization of *Beggiatoa alba* // Archives of Microbiology. — 1984. — V. 137, № 2. — P. 139–144.
101. Migula W. Ueber ein neues System der Bakterien // Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe. — 1894. — V. 1. — P. 235–238.
102. Motl N., Skiba M.A., Kabil O., Smith J.L., Banerjee R. Structural and biochemical analyses indicate that a bacterial persulfide dioxygenase-rhodanese fusion protein functions in sulfur assimilation // Journal of Biological Chemistry. — 2017. — V. 292, № 34. — P. 14026–14038.
103. Muntyan M.S., Grabovich M.Yu., Patrinskaya V.Yu., Dubinina G.A. Regulation of metabolic and electron transport pathways in the freshwater bacterium *Beggiatoa leptomitiformis* D-402 // Microbiology. — 2005. — V. 74, № 4. — P. 388–394.
104. Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A., Pannu N.S., Steiner R.A., Nicholls R.A., Winn M.D., Long F., Vagin A.A. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures // Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. — 2011. — V. 67, № 4. — P. 355–367.
105. Mußmann M., Hu F.Z., Richter M., de Beer D., Preisler A., Jørgensen B.B., Huntemann M., Glöckner F.O., Amann R., Koopman W.J.H., Lasken R.S., Janto B., Hogg J., Stoodley P., Boissy R., Ehrlich G.D. Insights into the genome of large sulfur bacteria revealed by analysis of single filaments // PLOS Biology. — 2007. — V. 5, № 9. — Art. e230.
106. Mußmann M., Schulz H.N., Strotmann B., Kjaer T., Nielsen L.P., Rosselló-Mora R.A., Amann R.I., Jørgensen B.B. Phylogeny and distribution of nitrate-storing *Beggiatoa* spp. in coastal marine sediments // Environmental Microbiology. — 2003. — V. 5, № 6. — P. 523–533.
107. Møller M.M., Nielsen L.P., Jørgensen B.B. Oxygen responses and mat formation by *Beggiatoa* spp. // Applied and Environmental Microbiology. — 1985. — V. 50, № 2. — P. 373–382.
108. Nelson D.C., Jørgensen B.B., Revsbech N.P. Growth pattern and yield of a chemoautotrophic *Beggiatoa* sp. in oxygen-sulfide microgradients // Applied and Environmental Microbiology. — 1986. — V. 52, № 2. — P. 225–233.
109. Nelson D.C., Waterbury J.B., Jannasch H.W. Nitrogen fixation and nitrate utilization by marine and freshwater *Beggiatoa* // Archives of Microbiology. — 1982. — V. 133, № 3. — P. 172–177.
110. Nelson D.C., Castenholz R.W. Use of reduced sulfur compounds by *Beggiatoa* sp. // Journal of Bacteriology. — 1981. — V. 147, № 1. — P. 140–154.
111. Nicolson G.L., Schmidt G.L. Structure of the *Chromatium* sulfur particle and its protein membrane // Journal of Bacteriology. — 1971. — V. 105, № 3. — P. 1142–1148.
112. Nurk S., Meleshko D., Korobeynikov A., Pevzner P.A. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler // Genome Research. — 2017. — V. 27, № 5. — P. 824–834.

113. O'Farrell P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins // *Journal of Biological Chemistry*. — 1975. — V. 250, № 10. — P. 4007–4021.
114. Orlova M.V., Tarlachkov S.V., Kulichenko E.I., Dubinina G.A., Tutukina M.N., Grabovich M.Y. Genomics and biochemistry of metabolic pathways for the C<sub>1</sub> compounds utilization in colorless sulfur bacterium *Beggiatoa leptomitiformis* D-402 // *Indian Journal of Microbiology*. — 2018. — V. 58, № 4. — P. 415–422.
115. Otte S., Kuenen J.G., Nielsen L.P., Paerl H.W., Zopfi J., Schulz H.N., Teske A., Strotmann B., Gallardo V.A., Jørgensen B.B. Nitrogen, carbon, and sulfur metabolism in natural *Thioploca* samples // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1999. — V. 65, № 7. — P. 3148–3157.
116. Overmann J. Mahoney Lake: a case study of the ecological significance of phototrophic sulfur bacteria // *Advances in Microbial Ecology* / Jones J.G. — Boston: Springer, 1997. — V. 15. — P. 251–288.
117. Parks D.H., Chuvochina M., Waite D.W., Rinke C., Skarszewski A., Chaumeil P.-A., Hugenholtz P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life // *Nature Biotechnology*. — 2018. — V. 36, № 10. — P. 996–1004.
118. Parks D.H., Chaumeil P.-A., Mussig A.J., Rinke C., Chuvochina M., Hugenholtz P. GTDB release 10: a complete and systematic taxonomy for 715 230 bacterial and 17 245 archaeal genomes // *Nucleic Acids Research*. — 2026. — V. 54, № D1. — P. D743–D754.
119. Parks D.H., Chuvochina M., Rinke C., Mussig A.J., Chaumeil P.-A., Hugenholtz P. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy // *Nucleic Acids Research*. — 2022. — V. 50, № D1. — P. D785–D794.
120. Pasteris J.D., Freeman J.J., Goffredi S.K., Buck K.R. Raman spectroscopic and laser scanning confocal microscopic analysis of sulfur in living sulfur-precipitating marine bacteria // *Chemical Geology*. — 2001. — V. 180, № 1-4. — P. 3–18.
121. Patrinskaya V.Yu., Grabovich M.Yu., Muntyan M.S., Dubinina G.A. Lithoautotrophic growth of the freshwater colorless sulfur bacterium *Beggiatoa* “*leptomitiformis*” D-402 // *Microbiology*. — 2001. — V. 70, № 2. — P. 145–150.
122. Pattaragulwanit K., Brune D.C., Trüper H.G., Dahl C. Molecular genetic evidence for extracytoplasmic localization of sulfur globules in *Chromatium vinosum* // *Archives of Microbiology*. — 1998. — V. 169, № 5. — P. 434–444.
123. Pettinati I., Brem J., McDonough M.A., Schofield C.J. Crystal structure of human persulfide dioxygenase: structural basis of ethylmalonic encephalopathy // *Human Molecular Genetics*. — 2015. — V. 24, № 9. — P. 2458–2469.
124. Petushkova N.A., Kuznetsova G.P., Larina O.V., Kisrieva Y.S., Samenkova N.F., Trifonova O.P., Miroshnichenko Y.V., Zolotarev K.V., Karuzina I.I., Ipatova O.M., Lisitsa A.V. One-dimensional proteomic profiling of *Danio rerio* embryo vitellogenin to estimate quantum dot toxicity // *Proteome Science*. — 2015. — V. 13. — Art. 17.

125. Pfennig N., Lippert K. Über das Vitamin B<sub>12</sub>-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien // Archiv für Mikrobiologie. — 1966. — V. 55, № 3. — P. 245–256.
126. Polman J.K., Larkin J.M. Properties of in vivo nitrogenase activity in *Beggiatoa alba* // Archives of Microbiology. — 1988. — V. 150, № 2. — P. 126–130.
127. Prange A., Chauvistré R., Modrow H., Hormes J., Trüper H.G., Dahl C. Quantitative speciation of sulfur in bacterial sulfur globules: X-ray absorption spectroscopy reveals at least three different species of sulfur // Microbiology. — 2002. — V. 148, № 1. — P. 267–276.
128. Prange A., Engelhardt H., Trüper H.G., Dahl C. The role of the sulfur globule proteins of *Allochromatium vinosum*: mutagenesis of the sulfur globule protein genes and expression studies by real-time RT-PCR // Archives of Microbiology. — 2004. — V. 182, № 2-3. — P. 165–174.
129. Ran M., Li Q., Xin Y., Ma S., Zhao R., Wang M., Xun L., Xia Y. Rhodaneses minimize the accumulation of cellular sulfane sulfur to avoid disulfide stress during sulfide oxidation in bacteria // Redox Biology. — 2022. — V. 53. — Art. 102345.
130. Ravin N.V., Rudenko T.S., Smolyakov D.D., Beletsky A.V., Gureeva M.V., Samylnina O.S., Grabovich M.Yu. History of the study of the genus *Thiothrix*: from the first enrichment cultures to pangenomic analysis // International Journal of Molecular Sciences. — 2022. — V. 23, № 17. — Art. 9531.
131. Ravin N.V., Rudenko T.S., Beletsky A.V., Smolyakov D.D., Mardanov A.V., Grabovich M.Yu., 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. — Art. 6028.
132. Ravin N.V., Smolyakov D.D., Markov N.D., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Rudenko T.S., Grabovich M.Yu. *tilS* and *rpoB*: new molecular markers for phylogenetic and biodiversity studies of the genus *Thiothrix* // Microorganisms. — 2023. — V. 11, № 10. — Art. 2521.
133. Rodriguez-R L.M., Konstantinidis K.T. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes // PeerJ Preprints. — 2016. — V. 4. — Art. e1900v1.
134. Rohwerder T., Sand W. The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. // Microbiology. — 2003. — V. 149, № 7. — P. 1699–1710.
135. Rosales S.M., Huebner L.K., Clark A.S., McMinds R., Ruzicka R.R., Muller E.M. Bacterial metabolic potential and micro-eukaryotes enriched in stony coral tissue loss disease lesions // Frontiers in Marine Science. — 2022. — V. 8. — Art. 776859.
136. Rudenko T.S., Tarlachkov S.V., Shatskiy N.D., Grabovich M.Y. Comparative genomics of *Beggiatoa leptomitiformis* strains D-401 and D-402<sup>T</sup> with contrasting physiology but extremely high level of genomic identity // Microorganisms. — 2020. — V. 8, № 6. — Art. 928.

137. 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 leptomitiformis*, where persulfide dioxygenase plays a key role // International Journal of Molecular Sciences. — 2024. — V. 25, № 20. — Art. 10962.
138. Rühl P., Haas P., Seipel D., Becker J., Kletzin A. Persulfide dioxygenase from *Acidithiobacillus caldus*: variable roles of cysteine residues and hydrogen bond networks of the active site // Frontiers in Microbiology. — 2018. — V. 9. — Art. 1610.
139. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Molecular Biology and Evolution. — 1987. — V. 4, № 4. — P. 406–425.
140. Salman V., Amann R., Girth A.C., Polerecky L., Bailey J.V., Høglund S., Jessen G., Pantoja S., Schulz-Vogt H.N. A single-cell sequencing approach to the classification of large, vacuolated sulfur bacteria // Systematic and Applied Microbiology. — 2011. — V. 34, № 4. — P. 243–259.
141. Salman V., Bailey J.V., Teske A. Phylogenetic and morphologic complexity of giant sulphur bacteria // Antonie van Leeuwenhoek. — 2013. — V. 104, № 2. — P. 169–186.
142. Salman-Carvalho V., Fadeev E., Joye S.B., Teske A. How clonal is clonal? Genome plasticity across multicellular segments of a “*Candidatus Marithrix* sp.” filament from sulfidic, briny seafloor sediments in the Gulf of Mexico // Frontiers in Microbiology. — 2016. — V. 7. — Art. 1173.
143. Sander J., Engels-Schwarzlose S., Dahl C. Importance of the DsrMKJOP complex for sulfur oxidation in *Allochromatium vinosum* and phylogenetic analysis of related complexes in other prokaryotes // Archives of Microbiology. — 2006. — V. 186, № 5. — P. 357–366.
144. Saravanakumar C., Dineshkumar N., Alavandi S.V., Salman V., Poornima M., Kalaimani N. Enrichment and identification of large filamentous sulfur bacteria related to *Beggiatoa* species from brackishwater ecosystems of Tamil Nadu along the southeast coast of India // Systematic and Applied Microbiology. — 2012. — V. 35, № 6. — P. 396–403.
145. Sattler S.A., Wang X., Lewis K.M., DeHan P.J., Park C.-M., Xin Y., Liu H., Xian M., Xun L., Kang C. Characterizations of two bacterial persulfide dioxygenases of the metallo- $\beta$ -lactamase superfamily // Journal of Biological Chemistry. — 2015. — V. 290, № 31. — P. 18914–18923.
146. Sauvé V., Roversi P., Leath K.J., Garman E.F., Antrobus R., Lea S.M., Berks B.C. Mechanism for the hydrolysis of a sulfur-sulfur bond based on the crystal structure of the thiosulfohydrolase SoxB // Journal of Biological Chemistry. — 2009. — V. 284, № 32. — P. 21707–21718.
147. Sayama M. Presence of nitrate-accumulating sulfur bacteria and their influence on nitrogen cycling in a shallow coastal marine sediment // Applied and Environmental Microbiology. — 2001. — V. 67, № 8. — P. 3481–3487.

148. Schmidt G.L., Nicolson G.L., Kamen M.D. Composition of the sulfur particle of *Chromatium vinosum* strain D // *Journal of Bacteriology*. — 1971. — V. 105, № 3. — P. 1137–1141.
149. Schmidt T.M., Vinci V.A., Strohl W.R. Protein synthesis by *Beggiatoa alba* B18LD in the presence and absence of sulfide // *Archives of Microbiology*. — 1986. — V. 144, № 2. — P. 158–162.
150. Schmidt T.M., Arieli B., Cohen Y., Padan E., Strohl W.R. Sulfur metabolism in *Beggiatoa alba* // *Journal of Bacteriology*. — 1987. — V. 169, № 12. — P. 5466–5472.
151. Schrödinger, LLC; DeLano W. PyMOL: software. — 2020. — URL: <https://www.pymol.org/2/> (дата обращения: 20 октября 2023).
152. Schulz H.N., Brinkhoff T., Ferdelman T.G., Mariné M.H., Teske A., Jørgensen B.B. Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian shelf sediments // *Science*. — 1999. — V. 284, № 5413. — P. 493–495.
153. Schulz H.N., de Beer D. Uptake rates of oxygen and sulfide measured with individual *Thiomargarita namibiensis* cells by using microelectrodes // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2002. — V. 68, № 11. — P. 5746–5749.
154. Schutte C.A., Teske A., MacGregor B.J., Salman-Carvalho V., Lavik G., Hach P., de Beer D. Filamentous giant *Beggiatoaceae* from the Guaymas Basin are capable of both denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2018. — V. 84, № 15. — Art. e02860-17.
155. Schwedt A., Kreutzmann A.-C., Polerecky L., Schulz-Vogt H.N. Sulfur respiration in a marine chemolithoautotrophic *Beggiatoa* strain // *Frontiers in Microbiology*. — 2012. — V. 2. — Art. 276.
156. Sharrar A.M., Flood B.E., Bailey J.V., Jones D.S., Biddanda B.A., Ruberg S.A., Marcus D.N., Dick G.J. Novel large sulfur bacteria in the metagenomes of groundwater-fed chemosynthetic microbial mats in the Lake Huron basin // *Frontiers in Microbiology*. — 2017. — V. 8. — Art. 791.
157. Shen J., Keithly M.E., Armstrong R.N., Higgins K.A., Edmonds K.A., Giedroc D.P. *Staphylococcus aureus* CstB is a novel multidomain persulfide dioxygenase–sulfurtransferase involved in hydrogen sulfide detoxification // *Biochemistry*. — 2015. — V. 54, № 29. — P. 4542–4554.
158. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels // *Analytical Chemistry*. — 1996. — V. 68, № 5. — P. 850–858.
159. Sieber C.M.K., Probst A.J., Sharrar A., Thomas B.C., Hess M., Tringe S.G., Banfield J.F. Recovery of genomes from metagenomes via a dereplication, aggregation and scoring strategy // *Nature Microbiology*. — 2018. — V. 3, № 7. — P. 836–843.
160. Smith D.J., Eglinton G., Morris R.J. Interfacial sediment and assessment of organic input from a highly productive water column // *Nature*. — 1983. — V. 304. — P. 259–262.
161. Stahl D.A., Lane D.J., Olsen G.J., Heller D.J., Schmidt T.M., Pace N.R. Phylogenetic analysis of certain sulfide-oxidizing and related morphologically

- conspicuous bacteria by 5S ribosomal ribonucleic acid sequences // International Journal of Systematic Bacteriology. — 1987. — V. 37, № 2. — P. 116–122.
162. Stockdreher Y., Venceslau S.S., Josten M., Sahl H.-G., Pereira I.A.C., Dahl C. Cytoplasmic sulfurtransferases in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: evidence for sulfur transfer from DsrEFH to DsrC // PLOS ONE. — 2012. — V. 7, № 7. — Art. e40785.
  163. Stockdreher Y., Sturm M., Josten M., Sahl H.-G., Dobler N., Zigann R., Dahl C. New proteins involved in sulfur trafficking in the cytoplasm of *Allochromatium vinosum* // Journal of Biological Chemistry. — 2014. — V. 289, № 18. — P. 12390–12403.
  164. Strohl W.R., Cannon G.C., Shively J.M., Güde H., Hook L.A., Lane C.M., Larkin J.M. Heterotrophic carbon metabolism by *Beggiatoa alba* // Journal of Bacteriology. — 1981a. — V. 148, № 2. — P. 572–583.
  165. Strohl W.R., Larkin J.M. Enumeration, isolation, and characterization of *Beggiatoa* from freshwater sediments // Applied and Environmental Microbiology. — 1978. — V. 36, № 5. — P. 755–770.
  166. Strohl W.R., Geffers I., Larkin J.M. Structure of the sulfur inclusion envelopes from four *Beggiatoas* // Current Microbiology. — 1981b. — V. 6, № 2. — P. 75–79.
  167. Strohl W.R., Howard K.S., Larkin J.M. Ultrastructure of *Beggiatoa alba* strain B15LD // Journal of General Microbiology. — 1982. — V. 128, № 1. — P. 73–84.
  168. Suzuki I. Oxidation of elemental sulfur by an enzyme system of *Thiobacillus thiooxidans* // Biochimica et Biophysica Acta. — 1965. — V. 104, № 2. — P. 359–371.
  169. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // Molecular Biology and Evolution. — 2013. — V. 30, № 12. — P. 2725–2729.
  170. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11 // Molecular Biology and Evolution. — 2021. — V. 38, № 7. — P. 3022–3027.
  171. Tanabe T.S., Bach E., D’Ermo G., Mohr M.G., Hager N., Pfeiffer N., Guiral M., Dahl C. A cascade of sulfur transferases delivers sulfur to the sulfur-oxidizing heterodisulfide reductase-like complex // Protein Science. — 2024. — V. 33, № 6. — Art. e5014.
  172. Teske A., Salman V. The Family *Beggiatoaceae* // The Prokaryotes / Rosenberg E. et al. — Berlin; Heidelberg: Springer, 2014. — P. 93–134.
  173. Teske A., Ramsing N.B., Küver J., Fossing H. Phylogeny of *Thioploca* and related filamentous sulfide-oxidizing bacteria // Systematic and Applied Microbiology. — 1995. — V. 18, № 4. — P. 517–526.
  174. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Research. — 1994. — V. 22, № 22. — P. 4673–4680.

175. Trevisan V. Prospetto della Flora Euganea. — Padova: Coi Tipi del Seminario, 1842.
176. Vargas A., Strohl W.R. Ammonia assimilation and metabolism by *Beggiatoa alba* // Archives of Microbiology. — 1985a. — V. 142, № 3. — P. 275–278.
177. Vargas A., Strohl W.R. Utilization of nitrate by *Beggiatoa alba* // Archives of Microbiology. — 1985b. — V. 142, № 3. — P. 279–284.
178. Vaudel M., Burkhart J.M., Zahedi R.P., Oveland E., Berven F.S., Sickmann A., Martens L., Barsnes H. PeptideShaker enables reanalysis of MS-derived proteomics data sets // Nature Biotechnology. — 2015. — V. 33, № 1. — P. 22–24.
179. Visser J.M., Robertson L.A., Van Verseveld H.W., Kuenen J.G. Sulfur production by obligately chemolithoautotrophic *Thiobacillus* species // Applied and Environmental Microbiology. — 1997. — V. 63, № 6. — P. 2300–2305.
180. Volland J.-M., Gonzalez-Rizzo S., Gros O., Tynl T., Ivanova N., Schulz F., Goudeau D., Elisabeth N.H., Nath N., Udworthy D., Malmstrom R.R., Guidi-Rontani C., Bolte-Kluge S., Davies K.M., Jean M.R., Mansot J.-L., Mouncey N.J., Angert E.R., Woyke T., Date S.V. A centimeter-long bacterium with DNA contained in metabolically active, membrane-bound organelles // Science. — 2022. — V. 376, № 6600. — P. 1453–1458.
181. Walker B.J., Abeel T., Shea T., Priest M., Abouelliel A., Sakthikumar S., Cuomo C.A., Zeng Q., Wortman J., Young S.K., Earl A.M. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement // PLOS ONE. — 2014. — V. 9, № 11. — Art. e112963.
182. Wang H., Liu S., Liu X., Li X., Wen Q., Lin J. Identification and characterization of an ETHE1-like sulfur dioxygenase in extremely acidophilic *Acidithiobacillus* spp. // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2014. — V. 98, № 17. — P. 7511–7522.
183. Wasmund K., Mußmann M., Loy A. The life sulfuric: microbial ecology of sulfur cycling in marine sediments // Environmental Microbiology Reports. — 2017. — V. 9, № 4. — P. 323–344.
184. Watanabe T., Kojima H., Umezawa K., Hori C., Takasuka T.E., Kato Y., Fukui M. Genomes of neutrophilic sulfur-oxidizing chemolithoautotrophs representing 9 proteobacterial species from 8 genera // Frontiers in Microbiology. — 2019. — V. 10. — Art. 316.
185. Weirather J.L., de Cesare M., Wang Y., Piazza P., Sebastiano V., Wang X.-J., Buck D., Au K.F. Comprehensive comparison of Pacific Biosciences and Oxford Nanopore Technologies and their applications to transcriptome analysis // F1000Research. — 2017. — V. 6. — Art. 100.
186. Weissgerber T., Sylvester M., Kröninger L., Dahl C. A comparative quantitative proteomic study identifies new proteins relevant for sulfur oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* // Applied and Environmental Microbiology. — 2014a. — V. 80, № 7. — P. 2279–2292.

187. Weissgerber T., Dobler N., Polen T., Latus J., Stockdreher Y., Dahl C. Genome-wide transcriptional profiling of the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* DSM 180<sup>T</sup> during growth on different reduced sulfur compounds // *Journal of Bacteriology*. — 2013. — V. 195, № 18. — P. 4231–4245.
188. Weissgerber T., Watanabe M., Hoefgen R., Dahl C. Metabolomic profiling of the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* during growth on different reduced sulfur compounds and malate // *Metabolomics*. — 2014b. — V. 10, № 6. — P. 1094–1112.
189. Winkel M., Salman-Carvalho V., Woyke T., Richter M., Schulz-Vogt H.N., Flood B.E., Bailey J.V., Mußmann M. Single-cell sequencing of *Thiomargarita* reveals genomic flexibility for adaptation to dynamic redox conditions // *Frontiers in Microbiology*. — 2016. — V. 7. — Art. 964.
190. Winogradsky S. Ueber Schwefelbakterien // *Botanische Zeitung*. — 1887. — V. 45, № 31-37. — P. 489–507, 513–523, 529–539, 545–559, 569–576, 585–594, 606–610.
191. Wu W., Pang X., Lin J., Liu X., Wang R., Lin J., Chen L. Discovery of a new subgroup of sulfur dioxygenases and characterization of sulfur dioxygenases in the sulfur metabolic network of *Acidithiobacillus caldus* // *PLOS ONE*. — 2017. — V. 12, № 9. — Art. e0183668.
192. Wu Y.W., Simmons B.A., Singer S.W. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets // *Bioinformatics*. — 2016. — V. 32, № 4. — P. 605–607.
193. Xia Y., Lü C., Hou N., Xin Y., Liu J., Liu H., Xun L. Sulfide production and oxidation by heterotrophic bacteria under aerobic conditions // *The ISME Journal*. — 2017. — V. 11, № 12. — P. 2754–2766.
194. Xin Y., Wang Y., Zhang H., Wu Y., Xia Y., Li H., Qu X. *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 alleviates sulfane sulfur toxicity after the loss of sulfane dehydrogenase through oxidation by persulfide dioxygenase and hydrogen sulfide release // *Metabolites*. — 2023. — V. 13, № 2. — Art. 218.
195. Xin Y., Liu H., Cui F., Liu H., Xun L. Recombinant *Escherichia coli* with sulfide:quinone oxidoreductase and persulfide dioxygenase rapidly oxidises sulfide to sulfite and thiosulfate via a new pathway // *Environmental Microbiology*. — 2016. — V. 18, № 12. — P. 5123–5136.
196. Xin Y., Gao R., Cui F., Lü C., Liu H., Liu H., Xia Y., Xun L. The heterotrophic bacterium *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 oxidizes sulfide to sulfate with thiosulfate as a key intermediate // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2020. — V. 86, № 22. — Art. e01835-20.
197. Zenskaya T.I., Chernitsyna S.M., Dul'tseva N.M., Sergeeva V.N., Pogodaeva T.V., Namsaraev B.B. Colorless sulfur bacteria *Thioploca* from different sites in Lake Baikal // *Microbiology*. — 2009. — V. 78, № 1. — P. 117–124.
198. Zopfi J., Kjaer T., Nielsen L.P., Jørgensen B.B. Ecology of *Thioploca* spp.: nitrate and sulfur storage in relation to chemical microgradients and influence of *Thioploca*

- spp. on the sedimentary nitrogen cycle // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2001. — V. 67, № 12. — P. 5530–5537.
199. Zougman A., Selby P.J., Banks R.E. Suspension trapping (STrap) sample preparation method for bottom-up proteomics analysis // *Proteomics*. — 2014. — V. 14, № 9. — P. 1006–1010.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

**Таблица А.1 — Аннотация генов основных метаболических путей представителей родов семейства *Beggiatoaceae***

В ячейках таблицы приведены идентификаторы locus\_tag соответствующих аннотированных генов; знаком «—» обозначено отсутствие соответствующего гена в геноме. “*Candidatus 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. “*Candidatus Albibeggiatoa*”: MAG WS — “*Ca. Albibeggiatoa psychrophila*” sp. nov.; MAG BB20 — “*Ca. Albibeggiatoa*” sp. nov.; MAG NOAA — “*Ca. Albibeggiatoa*” sp. nov.

| Ген             | WS_Bin1                              | Candidatus Parabeggiatoa   |                            |                            |                            |                            |                            | Candidatus Albibeggiatoa |                                 |             |
|-----------------|--------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------------|-------------|
|                 |                                      | Вид 3                      |                            |                            | Вид 1                      | Вид 2                      |                            | WS                       | BB20                            | NOAA        |
|                 |                                      | B5_G6                      | B2_G13                     | B37_G9                     | B3_G6                      | B38_G9                     | 4572_84                    |                          |                                 |             |
| Метаболизм серы |                                      |                            |                            |                            |                            |                            |                            |                          |                                 |             |
| sqrA            | VSS75_02127<br>5                     | DRR00_08310                | DRR16_31975                | DRQ99_05395                | –                          | DRR08_17890                | B6247_11585                | –                        | –                               | –           |
| sqrF            | VSS75_00411<br>5                     | DRR00_31765                | DRR16_23085                | –                          | –                          | DRR08_17595                | B6247_27355                | VSS52_00700<br>0         | JADGDW010000<br>128.1:7583–8713 | OIF49_00080 |
| fccB            | VSS75_00862<br>5<br>VSS75_01984<br>0 | DRR00_22230<br>DRR00_24470 | DRR16_25375<br>DRR16_22715 | DRQ99_02585<br>DRQ99_23735 | DRR19_20525<br>DRR19_32490 | DRR08_26115                | B6247_30515                | VSS52_00520<br>5         | JADGDW010000<br>046.1:1500–2795 | OIF49_01825 |
| fccA            | VSS75_01381<br>5<br>VSS75_01631<br>5 | DRR00_03695                | DRR16_05790                | DRQ99_03465                | DRR19_17900<br>DRR19_24540 | DRR08_13840<br>DRR08_08660 | B6247_05035<br>B6247_18595 | VSS52_01340<br>5         | JADGDW010000<br>274.1:995–1639  | OIF49_07960 |
| soxA            | VSS75_03300<br>5                     | DRR00_33930                | DRR16_02365                | DRQ99_32060                | DRR19_10780                | DRR08_27775                | –                          | VSS52_00825<br>5         | JADGDW010000<br>196.1:5266–6552 | OIF49_16500 |
| soxZ            | VSS75_00996<br>5                     | DRR00_27245                | DRR16_26840                | DRQ99_24730                | –                          | DRR08_08045                | B6247_07565                | VSS52_01308<br>5         | JADGDW010000<br>085.1:7810–8121 | OIF49_01130 |
| soxY            | VSS75_00996<br>0                     | DRR00_27240                | DRR16_26845                | DRQ99_24725                | DRR19_10775                | DRR08_08040                | B6247_07560                | VSS52_01309<br>0         | JADGDW010000<br>085.1:7337–7792 | OIF49_01125 |
| soxB            | VSS75_01223<br>0                     | DRR00_33820                | –                          | DRQ99_33260                | DRR19_10770                | DRR08_17445                | B6247_26440                | VSS52_01346<br>0         | JADGDW010000<br>014.1:16418–    | OIF49_07200 |
| soxX            | VSS75_03300<br>5                     | DRR00_33930                | DRR16_02365                | DRQ99_32060                | DRR19_10780                | DRR08_27775                | –                          | –                        | –                               | –           |

|             |                                      |             |             |             |             |             |             |                                      |                                                                          |             |
|-------------|--------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <i>soeA</i> | VSS75_03448<br>0                     | DRR00_29660 | DRR16_09120 | DRQ99_32925 | DRR19_31300 | DRR08_06420 | B6247_02880 | VSS52_01022<br>5                     | JADGDW010000<br>097.1:13054–<br>15990                                    | OIF49_13725 |
| <i>soeB</i> | VSS75_03368<br>0                     | DRR00_29665 | DRR16_09115 | –           | –           | DRR08_13670 | B6247_29500 | VSS52_01022<br>0                     | JADGDW010000<br>097.1:16323–<br>17015                                    | OIF49_13730 |
| <i>soeC</i> | VSS75_03368<br>5                     | DRR00_29670 | –           | –           | –           | DRR08_13665 | B6247_29495 | VSS52_01021<br>5                     | JADGDW010000<br>097.1:17027–<br>17950                                    | OIF49_13735 |
| <i>aprA</i> | VSS75_01174<br>5                     | DRR00_09645 | DRR16_23480 | DRQ99_07110 | DRR19_04780 | DRR08_30840 | B6247_08420 | –                                    | –                                                                        | –           |
| <i>aprB</i> | VSS75_01174<br>0                     | DRR00_09640 | DRR16_23475 | DRQ99_07105 | DRR19_04785 | DRR08_30845 | B6247_08425 | –                                    | –                                                                        | –           |
| <i>aprM</i> | –                                    | –           | –           | –           | –           | –           | –           | –                                    | –                                                                        | –           |
| <i>sat</i>  | VSS75_00103<br>0                     | –           | –           | DRQ99_30770 | DRR19_03955 | DRR08_33875 | –           | VSS52_00589<br>0                     | JADGDW010000<br>017.1:30951–<br>32123                                    | OIF49_09795 |
| <i>dsrA</i> | VSS75_01695<br>0                     | DRR00_01395 | DRR16_00480 | DRQ99_11820 | DRR19_00350 | DRR08_03775 | B6247_08475 | VSS52_00305<br>5                     | JADGDW010000<br>136.1:1–483<br>JADGDW010000<br>014.1:39021–<br>39914     | OIF49_05605 |
| <i>dsrB</i> | VSS75_01695<br>5                     | DRR00_01400 | DRR16_00475 | DRQ99_11825 | DRR19_00355 | DRR08_03770 | B6247_08480 | VSS52_00306<br>0                     | JADGDW010000<br>136.1:660–1730                                           | OIF49_05600 |
| <i>dsrE</i> | VSS75_01696<br>0                     | DRR00_01405 | DRR16_00470 | DRQ99_11830 | DRR19_00360 | DRR08_03765 | B6247_08485 | VSS52_00306<br>5                     | JADGDW010000<br>136.1:1746–2138                                          | OIF49_05595 |
| <i>dsrF</i> | VSS75_01696<br>5                     | DRR00_01410 | DRR16_00465 | DRQ99_11835 | DRR19_00365 | DRR08_03760 | B6247_08490 | VSS52_00307<br>0                     | JADGDW010000<br>136.1:2149–2571                                          | OIF49_05590 |
| <i>dsrH</i> | VSS75_01697<br>0                     | DRR00_01415 | DRR16_00460 | DRQ99_11840 | DRR19_03130 | DRR08_03755 | B6247_08495 | VSS52_00307<br>5                     | JADGDW010000<br>136.1:2584–2892                                          | OIF49_05585 |
| <i>dsrC</i> | VSS75_01697<br>5<br>VSS75_02489<br>5 | DRR00_01420 | DRR16_00455 | DRQ99_11845 | DRR19_03135 | DRR08_03750 | B6247_08500 | VSS52_00308<br>0<br>VSS52_00695<br>5 | JADGDW010000<br>136.1:3162–3512<br>JADGDW010000<br>014.1:14491–<br>14823 | OIF49_05580 |
| <i>dsrM</i> | VSS75_01698<br>0                     | DRR00_01425 | DRR16_00450 | DRQ99_11850 | DRR19_03140 | DRR08_03745 | B6247_08505 | VSS52_00308<br>5                     | JADGDW010000<br>136.1:3617–4357                                          | OIF49_05575 |

|                         |                  |                            |                            |                            |                  |                            |                            |                  |                                       |             |
|-------------------------|------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------|----------------------------|----------------------------|------------------|---------------------------------------|-------------|
| <i>dsrK</i>             | VSS75_01698<br>5 | DRR00_01430                | DRR16_00445                | DRQ99_11855                | DRR19_03145      | DRR08_03740                | B6247_08510                | VSS52_00309<br>0 | JADGDW010000<br>136.1:4367–5884       | OIF49_05570 |
| <i>dsrL</i>             | VSS75_01699<br>0 | DRR00_01060                | DRR16_13725                | DRQ99_06210                | DRR19_03155      | DRR08_03735                | B6247_00595<br>B6247_08515 | VSS52_01387<br>5 | JADGDW010000<br>136.1:7027–9012       | OIF49_05555 |
| <i>dsrJ</i>             | VSS75_01699<br>5 | DRR00_01435                | DRR16_00440                | DRQ99_11860                | DRR19_03160      | DRR08_03730                | B6247_08520<br>B6247_08500 | VSS52_01388<br>0 | JADGDW010000<br>136.1:9012–9449       | OIF49_05550 |
| <i>dsrO</i>             | VSS75_01700<br>5 | DRR00_01450                | DRR16_00425                | DRQ99_10320                | DRR19_03190      | DRR08_03710                | B6247_08540                | –                | JADGDW010000<br>136.1:9883–<br>10617  | OIF49_05540 |
| <i>dsrP</i>             | VSS75_01701<br>0 | DRR00_01455                | DRR16_00420                | DRQ99_10315                | DRR19_03195      | DRR08_03705<br>DRR08_03700 | B6247_08545<br>B6247_08550 | –                | JADGDW010000<br>136.1:10630–<br>11853 | OIF49_05535 |
| <i>dsrN</i>             | VSS75_01808<br>0 | DRR00_19305                | DRR16_13405                | DRQ99_22100                | DRR19_33465      | DRR08_18320                | –                          | VSS52_01228<br>0 | JADGDW010000<br>040.1:26184–<br>27563 | OIF49_02400 |
| <i>dsrR</i>             | VSS75_01808<br>5 | DRR00_19310                | DRR16_13410                | DRQ99_22105                | DRR19_02855      | DRR08_18325                | –                          | VSS52_01228<br>5 | JADGDW010000<br>040.1:27556–<br>27870 | OIF49_02395 |
| <i>dsrS</i>             | VSS75_00901<br>5 | DRR00_03515                | DRR16_11220                | DRQ99_16430                | DRR19_22290      | DRR08_22380                | B6247_10535                | VSS52_00167<br>0 | JADGDW010000<br>084.1:4620–5741       | OIF49_09950 |
| <b>Метаболизм азота</b> |                  |                            |                            |                            |                  |                            |                            |                  |                                       |             |
| <i>narG</i>             | VSS75_00203<br>5 | DRR00_08515                | DRR16_04045                | DRQ99_06725                | DRR19_09440      | DRR08_12135                | B6247_13690                | –                | –                                     | –           |
| <i>narH</i>             | VSS75_00453<br>5 | DRR00_08510                | DRR16_04050                | DRQ99_06720                | DRR19_09435      | DRR08_12140                | B6247_13685                | –                | –                                     | –           |
| <i>narI</i>             | VSS75_00454<br>5 | DRR00_08500                | DRR16_04060                | DRQ99_06710                | DRR19_09425      | DRR08_12150                | B6247_13675                | –                | –                                     | –           |
| <i>narJ</i>             | VSS75_00454<br>0 | DRR00_08505                | DRR16_04055                | DRQ99_06715                | DRR19_09430      | DRR08_12145                | B6247_13680                | –                | –                                     | –           |
| <i>nirS</i>             | –                | DRR00_01920<br>DRR00_23130 | DRR16_05745<br>DRR16_18270 | DRQ99_00305<br>DRQ99_19770 | –                | DRR08_29220<br>DRR08_01700 | B6247_29295<br>B6247_00210 | –                | –                                     | –           |
| <i>norB</i>             | VSS75_00228<br>0 | DRR00_00825                | DRR16_24930<br>DRR16_28765 | DRQ99_09195<br>DRQ99_25095 | DRR19_03645<br>– | DRR08_07090<br>DRR08_08455 | B6247_16575<br>B6247_23100 | –                | –                                     | –           |
| <i>norC</i>             | VSS75_00227<br>5 | DRR00_30325<br>DRR00_00830 | DRR16_28760<br>DRR16_24925 | DRQ99_25090<br>DRQ99_09200 | DRR19_03650      | DRR08_07085<br>DRR08_08460 | B6247_16580<br>B6247_23095 | –                | –                                     | –           |
| <i>nosZ</i>             | –                | DRR00_32385<br>DRR00_18020 | DRR16_32135<br>DRR16_31555 | DRQ99_31360<br>DRQ99_14200 | –                | DRR08_16085<br>DRR08_31540 | B6247_19225                | –                | –                                     | –           |

|              |                                                          |                            |                            |                            |                            |                            |                            |                                      |                                                                               |             |
|--------------|----------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <i>napA</i>  | VSS75_02247<br>5                                         | –                          | –                          | –                          | DRR19_12295                | DRR08_01680                | B6247_00190                | VSS52_00737<br>5                     | JADGDW010000<br>017.1:719–3223                                                | OIF49_15615 |
| <i>napB</i>  | VSS75_02248<br>0                                         | –                          | –                          | –                          | DRR19_12310                | DRR08_01675                | B6247_00185                | –                                    | JADGDW010000<br>017.1:4976–5431                                               | OIF49_15630 |
| <i>nirB</i>  | –                                                        | DRR00_03535                | DRR16_18655                | DRQ99_16450                | DRR19_04940                | DRR08_33890<br>DRR08_21880 | B6247_26420<br>B6247_28700 | VSS52_00077<br>0                     | JADGDW010000<br>154.1:8898–<br>10391<br>JADGDW010000<br>117.1:14251–<br>15198 | OIF49_16470 |
| <i>nirD</i>  | –                                                        | DRR00_03530                | DRR16_18650                | DRQ99_16445                | DRR19_04945                | DRR08_21875                | B6247_28705                | VSS52_00076<br>5                     | JADGDW010000<br>018.1:10045–<br>10362                                         | OIF49_16465 |
| <i>nasA</i>  | –                                                        | DRR00_03540                | DRR16_18660                | DRQ99_16455                | DRR19_04495                | DRR08_25760                | B6247_26475                | VSS52_00076<br>0<br>VSS52_00029<br>0 | JADGDW010000<br>018.1:7378–<br>10044                                          | OIF49_16460 |
| <i>nifA</i>  | –                                                        | –                          | –                          | –                          | –                          | –                          | –                          | –                                    | JADGDW010000<br>152.1:7292–8809                                               | OIF49_08595 |
| <i>nifS</i>  | VSS75_02241<br>5<br>VSS75_02536<br>5<br>VSS75_03364<br>5 | DRR00_26720<br>DRR00_05900 | DRR16_30870<br>DRR16_30440 | DRQ99_26640<br>DRQ99_26070 | DRR19_27035<br>DRR19_16955 | DRR08_20405<br>DRR08_26490 | B6247_26315<br>B6247_27385 | VSS52_00384<br>0                     | JADGDW010000<br>226.1:2830–3963<br>JADGDW010000<br>118.1:1024–2235            | OIF49_15225 |
| <i>nifU</i>  | VSS75_02536<br>0                                         | –                          | –                          | –                          | –                          | –                          | –                          | –                                    | JADGDW010000<br>118.1:2232–3125                                               | OIF49_15230 |
| <i>nifB</i>  | –                                                        | –                          | –                          | –                          | –                          | –                          | –                          | –                                    | JADGDW010000<br>006.1:2429–3925                                               | OIF49_06635 |
| <i>nifX</i>  | –                                                        | –                          | –                          | –                          | –                          | –                          | –                          | –                                    | JADGDW010000<br>234.1:4008–4439                                               | OIF49_15215 |
| <i>nifX2</i> | –                                                        | –                          | –                          | –                          | –                          | –                          | –                          | –                                    | JADGDW010000<br>006.1:4333–4806                                               | OIF49_06645 |
| <i>nifE</i>  | –                                                        | –                          | –                          | –                          | –                          | –                          | –                          | –                                    | JADGDW010000<br>051.1:21030–<br>22400                                         | OIF49_13695 |
| <i>nifN</i>  | –                                                        | –                          | –                          | –                          | –                          | –                          | –                          | –                                    | JADGDW010000<br>118.1:2–865<br>JADGDW010000<br>234.1:4453–5136                | OIF49_15220 |

|                           |                  |             |             |             |             |                            |             |                  |                                       |                            |
|---------------------------|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------------------|-------------|------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| <i>nifQ</i>               | –                | –           | –           | –           | –           | –                          | –           | –                | JADGDW010000<br>004.1:3492–4094       | OIF49_11295                |
| <i>nifV</i>               | –                | –           | –           | –           | –           | –                          | –           | –                | JADGDW010000<br>047.1:17165–<br>18310 | OIF49_11765                |
| <i>nifW</i>               | –                | –           | –           | –           | –           | –                          | –           | –                | JADGDW010000<br>047.1:15323–<br>15658 | OIF49_11780                |
| <i>nifM</i>               | –                | –           | –           | –           | –           | –                          | –           | VSS52_00685<br>0 | JADGDW010000<br>047.1:13591–<br>14451 | OIF49_11790                |
| <i>nifH</i>               | –                | –           | –           | –           | –           | –                          | –           | –                | JADGDW010000<br>026.1:20865–<br>21743 | OIF49_10280                |
| <i>nifD</i>               | –                | –           | –           | –           | –           | –                          | –           | –                | JADGDW010000<br>026.1:21916–<br>23397 | OIF49_10275                |
| <i>nifK</i>               | –                | –           | –           | –           | –           | –                          | –           | –                | JADGDW010000<br>162.1:1175–2746       | OIF49_05440                |
| <i>nifZ</i>               | –                | –           | –           | –           | –           | –                          | –           | –                | JADGDW010000<br>047.1:14448–<br>14900 | OIF49_11785                |
| <i>nifT</i>               | –                | –           | –           | –           | –           | –                          | –           | –                | JADGDW010000<br>162.1:2843–3052       | OIF49_05435                |
| <i>nifO</i>               | –                | –           | –           | –           | –           | –                          | –           | –                | JADGDW010000<br>004.1:522–941         | OIF49_11320                |
| <b>Метаболизм фосфора</b> |                  |             |             |             |             |                            |             |                  |                                       |                            |
| <i>phoU</i>               | VSS75_02745<br>0 | –           | –           | –           | –           | DRR08_06510<br>DRR08_28335 | B6247_00940 | –                | JADGDW010000<br>008.1:15447–<br>16163 | OIF49_13425                |
| <i>phoR</i>               | VSS75_02596<br>5 | –           | –           | –           | –           | DRR08_28355                | –           | VSS52_01070<br>0 | JADGDW010000<br>008.1:7389–8693       | OIF49_00325                |
| <i>phoB</i>               | VSS75_03483<br>0 | –           | –           | –           | –           | DRR08_28350                | –           | VSS52_01069<br>5 | JADGDW010000<br>008.1:6694–7392       | OIF49_00320                |
| <i>pstS</i>               | VSS75_00733<br>0 | DRR00_09990 | DRR16_04530 | DRQ99_09935 | DRR19_12260 | DRR08_29965                | B6247_28315 | VSS52_01322<br>0 | JADGDW010000<br>003.1:5500–6465       | OIF49_08475<br>OIF49_16710 |

|                                                               |                  |                            |                            |                            |             |             |             |                  |                                       |             |
|---------------------------------------------------------------|------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------|-------------|-------------|------------------|---------------------------------------|-------------|
| <i>pstA</i>                                                   | VSS75_03239<br>5 | –                          | –                          | –                          | –           | DRR08_27105 | –           | VSS52_00515<br>5 | JADGDW010000<br>008.1:17207–<br>18859 | OIF49_13415 |
| <i>pstC</i>                                                   | VSS75_03240<br>0 | –                          | –                          | –                          | –           | DRR08_27100 | B6247_28360 | VSS52_00515<br>0 | JADGDW010000<br>008.1:18990–<br>21302 | OIF49_13410 |
| <i>pstB</i>                                                   | VSS75_02744<br>5 | –                          | –                          | –                          | DRR19_20785 | DRR08_02700 | B6247_00935 | VSS52_00516<br>0 | JADGDW010000<br>008.1:8417–<br>17155  | OIF49_13420 |
| <i>ppk1</i>                                                   | VSS75_01443<br>0 | DRR00_17390                | DRR16_04665                | DRQ99_27750<br>DRQ99_26150 | DRR19_00290 | DRR08_02910 | B6247_14525 | VSS52_00485<br>0 | JADGDW010000<br>079.1:8417–<br>10555  | OIF49_09325 |
| <i>ppk2/<br/>pap</i>                                          | VSS75_00274<br>0 | DRR00_02365                | DRR16_06160                | DRQ99_01330                | DRR19_29520 | DRR08_29010 | B6247_20255 | VSS52_00723<br>0 | JADGDW010000<br>224.1:1830–3341       | OIF49_14990 |
| <i>epp</i>                                                    | –                | –                          | –                          | –                          | –           | –           | –           | VSS52_01082<br>5 | JADGDW010000<br>027.1:19204–<br>20730 | OIF49_10625 |
| <i>ppa</i>                                                    | –                | –                          | –                          | –                          | DRR19_25315 | –           | –           | VSS52_00936<br>0 | JADGDW010000<br>089.1:9737–<br>10285  | OIF49_14800 |
| <b>Путь Эмбдена–Мейергофа и цикл Кальвина–Бенсона–Бэссема</b> |                  |                            |                            |                            |             |             |             |                  |                                       |             |
| <i>glk</i>                                                    | VSS75_02179<br>0 | DRR00_32610                | DRR16_05915                | DRQ99_15845                | DRR19_33485 | –           | –           | VSS52_00370<br>0 | JADGDW010000<br>077.1:7780–8853       | OIF49_08090 |
| <i>pgi</i>                                                    | VSS75_00737<br>0 | DRR00_11325                | DRR16_05795                | DRQ99_27430                | DRR19_13015 | DRR08_01405 | B6247_00725 | VSS52_00299<br>5 | JADGDW010000<br>002.1:32287–<br>33936 | OIF49_12625 |
| <i>pfk</i>                                                    | VSS75_02815<br>0 | –                          | DRR16_16660                | DRQ99_07960                | DRR19_10005 | DRR08_17340 | B6247_28440 | VSS52_00896<br>0 | JADGDW010000<br>104.1:13623–<br>14885 | OIF49_13175 |
| <i>fbaA</i>                                                   | VSS75_02831<br>0 | DRR00_24830                | DRR16_06495                | DRQ99_21710                | DRR19_12425 | DRR08_05125 | B6247_18475 | VSS52_00869<br>0 | JADGDW010000<br>214.1:3415–4476       | OIF49_13950 |
| <i>tpiA</i>                                                   | VSS75_00659<br>5 | –                          | DRR16_18320                | DRQ99_08015                | DRR19_07525 | DRR08_08180 | B6247_13405 | VSS52_00353<br>5 | JADGDW010000<br>276.1:2091–2747       | OIF49_11590 |
| <i>gapA</i>                                                   | VSS75_00247<br>5 | DRR00_11155<br>DRR00_07635 | DRR16_11770<br>DRR16_16960 | DRQ99_11255<br>DRQ99_12485 | DRR19_02270 | DRR08_23570 | B6247_19605 | VSS52_00038<br>0 | JADGDW010000<br>030.1:30050–<br>31078 | OIF49_05875 |

|                                                                                 |                  |             |             |             |                            |             |             |                  |                                       |             |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------|-------------|-------------|----------------------------|-------------|-------------|------------------|---------------------------------------|-------------|
| <i>pgk</i>                                                                      | VSS75_02832<br>0 | DRR00_24820 | DRR16_06485 | DRQ99_21700 | DRR19_33375<br>DRR19_12415 | DRR08_05135 | B6247_18465 | VSS52_01151<br>5 | JADGDW010000<br>008.1:22206–<br>23381 | OIF49_14195 |
| <i>gpmA</i>                                                                     | VSS75_00082<br>5 | DRR00_28580 | DRR16_27010 | DRQ99_21950 | DRR19_08975                | DRR08_09900 | B6247_14920 | VSS52_01102<br>5 | JADGDW010000<br>126.1:553–1299        | OIF49_00720 |
| <i>gpmB</i>                                                                     | VSS75_00770<br>5 | DRR00_09985 | DRR16_04525 | DRQ99_09930 | DRR19_09400                | DRR08_21770 | B6247_14855 | –                | JADGDW010000<br>045.1:21100–<br>21624 | OIF49_12970 |
| <i>eno</i>                                                                      | VSS75_01090<br>0 | DRR00_21025 | DRR16_30780 | DRQ99_28425 | DRR19_17365                | DRR08_09640 | B6247_29225 | VSS52_01078<br>5 | JADGDW010000<br>206.1:387–1670        | OIF49_04915 |
| <i>pyk</i>                                                                      | –                | DRR00_24825 | DRR16_06490 | DRQ99_21705 | –                          | DRR08_05130 | B6247_18470 | –                | –                                     | –           |
| <i>aceE</i>                                                                     | VSS75_00654<br>5 | DRR00_09810 | DRR16_17135 | DRQ99_06630 | DRR19_20760                | DRR08_12730 | B6247_05460 | VSS52_00069<br>5 | JADGDW010000<br>070.1:5273–7948       | OIF49_04505 |
| <i>pdhD</i>                                                                     | VSS75_02713<br>0 | DRR00_32580 | DRR16_32085 | DRQ99_30665 | DRR19_22955                | DRR08_04170 | B6247_01885 | VSS52_00731<br>0 | JADGDW010000<br>028.1:1457–2989       | OIF49_15665 |
| <i>rpiA</i>                                                                     | VSS75_00409<br>0 | DRR00_27270 | DRR16_21440 | DRQ99_32610 | DRR19_15760                | DRR08_02745 | B6247_07320 | VSS52_00382<br>0 | JADGDW010000<br>148.1:399–1055        | OIF49_17915 |
| <i>rpe</i>                                                                      | VSS75_03524<br>0 | DRR00_06400 | DRR16_28300 | DRQ99_04415 | –                          | DRR08_04715 | B6247_12545 | VSS52_00552<br>0 | JADGDW010000<br>078.1:5925–6599       | OIF49_07590 |
| <i>tktA</i>                                                                     | VSS75_00248<br>0 | DRR00_11160 | DRR16_11775 | DRQ99_11260 | DRR19_02265                | DRR08_23575 | B6247_19600 | VSS52_00645<br>5 | JADGDW010000<br>041.1:26853–<br>28838 | OIF49_07385 |
| <i>fbp</i>                                                                      | –                | –           | –           | –           | –                          | –           | –           | VSS52_01214<br>5 | JADGDW010000<br>184.1:3–992           | OIF49_01480 |
| <i>rbcL</i>                                                                     | VSS75_02773<br>0 | DRR00_20920 | DRR16_16165 | DRQ99_17770 | DRR19_14995                | DRR08_23505 | B6247_08135 | VSS52_01387<br>0 | JADGDW010000<br>122.1:13308–<br>14687 | OIF49_03190 |
| <i>rbcS</i>                                                                     | –                | –           | –           | –           | DRR19_15000                | DRR08_23500 | B6247_08140 | –                | –                                     | –           |
| <i>prkB</i>                                                                     | VSS75_03269<br>0 | DRR00_04215 | DRR16_07980 | DRQ99_02015 | DRR19_09145                | DRR08_00570 | B6247_05265 | –                | JADGDW010000<br>063.1:16772–<br>17413 | OIF49_02720 |
| <b>Цикл трикарбоновых кислот, глиоксилатный цикл и анаплеротические реакции</b> |                  |             |             |             |                            |             |             |                  |                                       |             |
| <i>glta</i>                                                                     | VSS75_02676<br>0 | DRR00_11200 | DRR16_31465 | DRQ99_20475 | DRR19_21850                | DRR08_21030 | B6247_15000 | VSS52_00186<br>0 | JADGDW010000<br>014.1:32985–<br>34283 | OIF49_03840 |

|                     |                                      |             |             |             |             |             |             |                  |                                                                    |             |
|---------------------|--------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------|
| <i>acnB</i>         | VSS75_03431<br>0                     | DRR00_11085 | DRR16_00980 | DRQ99_07190 | DRR19_27465 | DRR08_11890 | B6247_15290 | VSS52_00963<br>5 | JADGDW010000<br>093.1:6463–9024                                    | OIF49_10380 |
| <i>idh</i>          | VSS75_00528<br>5                     | DRR00_28260 | DRR16_24525 | DRQ99_20175 | DRR19_15580 | DRR08_15225 | B6247_15975 | VSS52_00025<br>5 | JADGDW010000<br>075.1:5860–7623                                    | OIF49_03740 |
| <i>sucA</i>         | VSS75_00345<br>5                     | DRR00_28895 | DRR16_03325 | DRQ99_23075 | DRR19_12170 | DRR08_04160 | B6247_01870 | VSS52_00187<br>0 | JADGDW010000<br>028.1:4310–7129                                    | OIF49_15655 |
| <i>sucB</i>         | VSS75_02712<br>5                     | DRR00_32575 | DRR16_32080 | DRQ99_30660 | DRR19_22950 | DRR08_04165 | B6247_01875 | VSS52_00730<br>5 | JADGDW010000<br>028.1:3045–4184                                    | OIF49_15660 |
| <i>sucD</i>         | VSS75_03481<br>5                     | DRR00_07675 | DRR16_03005 | DRQ99_17495 | DRR19_15850 | DRR08_05700 | B6247_02190 | VSS52_00662<br>5 | JADGDW010000<br>199.1:5714–6589                                    | OIF49_12665 |
| <i>sucC</i>         | VSS75_03481<br>0                     | DRR00_07670 | DRR16_03010 | DRQ99_17490 | DRR19_15845 | DRR08_05705 | B6247_02195 | VSS52_00663<br>0 | JADGDW010000<br>199.1:5172–5711<br>JADGDW010000<br>199.1:4545–5123 | OIF49_12660 |
| <i>sdhA</i>         | VSS75_02857<br>5                     | DRR00_22930 | DRR16_18410 | DRQ99_20045 | DRR19_30525 | DRR08_01035 | B6247_03010 | VSS52_00574<br>0 | JADGDW010000<br>207.1:2642–4429                                    | OIF49_11395 |
| <i>sdhB</i>         | VSS75_02619<br>5                     | DRR00_27580 | DRR16_25020 | DRQ99_25500 | DRR19_14365 | DRR08_01040 | B6247_03015 | VSS52_00573<br>5 | JADGDW010000<br>207.1:4442–5221                                    | OIF49_11400 |
| <i>sdhC</i>         | VSS75_02856<br>5                     | DRR00_22940 | DRR16_18420 | DRQ99_20035 | DRR19_30515 | DRR08_01025 | B6247_03000 | VSS52_00575<br>0 | JADGDW010000<br>207.1:1833–2225                                    | OIF49_11385 |
| <i>sdhD</i>         | VSS75_02857<br>0                     | DRR00_22935 | DRR16_18415 | DRQ99_20040 | DRR19_30520 | DRR08_01030 | B6247_03005 | VSS52_00574<br>5 | JADGDW010000<br>207.1:2225–2635                                    | OIF49_11390 |
| <i>fumA</i>         | VSS75_00610<br>0                     | DRR00_06150 | DRR16_20830 | DRQ99_32645 | DRR19_14325 | DRR08_21960 | B6247_19805 | VSS52_01151<br>0 | JADGDW010000<br>010.1:6577–8091                                    | OIF49_09155 |
| <i>mqo/<br/>mdh</i> | VSS75_02833<br>5                     | DRR00_26630 | DRR16_25255 | DRQ99_23455 | DRR19_12165 | DRR08_04155 | B6247_01865 | VSS52_00186<br>5 | JADGDW010000<br>028.1:7604–8581                                    | OIF49_15650 |
| <i>pckA</i>         | –                                    | DRR00_17285 | DRR16_20010 | DRQ99_26835 | DRR19_22235 | DRR08_08445 | B6247_16915 | VSS52_00996<br>5 | JADGDW010000<br>187.1:1303–2913                                    | OIF49_16940 |
| <i>aspB</i>         | –                                    | DRR00_24565 | DRR16_18240 | DRQ99_22880 | DRR19_13860 | DRR08_29340 | B6247_25435 | –                | JADGDW010000<br>169.1:6745–7926                                    | OIF49_15080 |
| <i>gltB</i>         | VSS75_01921<br>0<br>VSS75_02112<br>5 | DRR00_04160 | DRR16_29530 | DRQ99_01820 | DRR19_25335 | DRR08_07115 | B6247_16550 | VSS52_00064<br>0 | JADGDW010000<br>018.1:22685–<br>27142                              | OIF49_05020 |
| <i>gltD</i>         | VSS75_02811<br>0                     | DRR00_00550 | DRR16_00140 | DRQ99_23950 | –           | DRR08_08060 | B6247_07580 | VSS52_00090<br>0 | JADGDW010000<br>085.1:18186–<br>19502                              | OIF49_15720 |
| <i>aceA</i>         | –                                    | –           | –           | –           | –           | –           | –           | VSS52_00812<br>5 | JADGDW010000<br>185.1:4939–6246                                    | OIF49_11070 |

|                               |                  |             |             |             |             |             |             |                  |                                                                        |             |
|-------------------------------|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <i>aceB</i>                   | –                | –           | –           | –           | –           | –           | –           | VSS52_00813<br>0 | JADGDW010000<br>185.1:6418–8013                                        | OIF49_11065 |
| <i>maeB</i>                   | VSS75_02149<br>0 | DRR00_32160 | DRR16_19095 | DRQ99_21025 | DRR19_26375 | DRR08_03935 | B6247_06395 | VSS52_01192<br>0 | JADGDW010000<br>245.1:420–2759                                         | OIF49_02030 |
| <i>ppc</i>                    | –                | –           | –           | –           | –           | DRR08_14765 | B6247_12910 | VSS52_00141<br>5 | JADGDW010000<br>013.1:3730–6552                                        | OIF49_08665 |
| <i>pus</i>                    | –                | –           | –           | –           | –           | –           | –           | –                | –                                                                      | –           |
| <b>Антиоксидантная защита</b> |                  |             |             |             |             |             |             |                  |                                                                        |             |
| <i>gpx</i>                    | –                | –           | –           | –           | –           | –           | –           | –                | –                                                                      | OIF49_02045 |
| <i>SOD2</i>                   | VSS75_02180<br>0 | DRR00_05575 | DRR16_24285 | DRQ99_10035 | DRR19_28875 | DRR08_12015 | B6247_06830 | –                | JADGDW010000<br>094.1:15372–<br>15956                                  | OIF49_09535 |
| <i>SOD1</i>                   | –                | –           | –           | –           | –           | –           | –           | –                | –                                                                      | –           |
| <i>PRDX<br/>5</i>             | VSS75_01634<br>0 | DRR00_15315 | DRR16_09735 | DRQ99_25275 | DRR19_12950 | DRR08_02800 | B6247_07270 | VSS52_00285<br>0 | –                                                                      | OIF49_17835 |
| <i>CAT</i>                    | –                | –           | –           | –           | –           | –           | –           | –                | –                                                                      | –           |
| <i>ccp</i>                    | VSS75_00730<br>0 | DRR00_30205 | DRR16_28410 | DRQ99_28660 | DRR19_13685 | DRR08_19045 | B6247_12145 | VSS52_01095<br>5 | JADGDW010000<br>288.1:50–1342<br>JADGDW010000<br>001.1:58056–<br>59060 | OIF49_01530 |
| <i>CAT2</i>                   | –                | –           | –           | –           | –           | –           | –           | –                | –                                                                      | –           |