На правах рукописи

Гололобова Александра Вадимовна

ОБЛИГАТНО АВТОТРОФНЫЕ АЦЕТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ: ТАКСОНОМИЯ, МЕТАБОЛИЗМ, ЭКОЛОГИЯ

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Москва – 2026

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

Научный руководитель: **Фролов Евгений Николаевич,**
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией метаболизма экстремофильных прокариот Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Официальные оппоненты: **Котова Ирина Борисовна,**
доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Тутукина Мария Николаевна,
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Центра биомедицинских исследований, Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии».

Защита диссертации состоится «21» января 2027 года в 11-00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.233.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 117312, г. Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2.
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН (117312, г. Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН: https://www.fbras.ru/materialyi-k-zashhite-gololobovoy-a-v.html

Автореферат разослан «___» _____ 2026 года

Ученый секретарь диссертационного совета — доктор биологических наук Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Ацетогенные микроорганизмы представляют собой физиологическую группу прокариот, которые в процессе анаэробного дыхания из двух молекул углекислого газа, выступающего в роли терминального акцептора электронов, образуют одну молекулу ацетата, являющегося конечным продуктом метаболизма (Schuchmann and Müller, 2014). Всестороннее исследование ацетогенных прокариот имеет большое значение в развитии технологии микробной ферментации синтез-газа, что связано с запросом промышленности на получение биотоплива, растворителей и прочих полезных химических веществ из таких соединений, как H_2/CO_2, CO или же синтез-газ (Orsi et al., 2023; Xu et al., 2023), являющихся компонентами отходящих и технологических газов ряда производств, прежде всего металлургических (Lv et al., 2023). Процесс переработки синтез-газа позволяет не только производить полезные химические вещества, но и сокращать количество выбросов технологических газов в ряде отраслей промышленности, использующих ископаемое топливо для производства электроэнергии и тепла.

Передовым направлением в развитии технологии микробной ферментации синтез-газа является метаболическая инженерия ацетогенных прокариот, которая направлена на создание штаммов-продуцентов более сложных соединений, чем ацетат, например, этанола, бутанола, гексанола, изопропанола, аминокислот, 2,3-бутандиола, бутирата и других (Bengelsdorf et al., 2018; Müller, 2019). Мировым лидером в области ацетогенной ферментации синтез-газа является компания LanzaTech, которая первоначально возникла в Новой Зеландии, а на данный момент является международной (США, Европа, Индия, Китай) (Bengelsdorf et al., 2018). Для производства биотоплива из отходящих газов сталелитейных заводов компания LanzaTech использует промышленные штаммы *‘Clostridium autoethanogenum’*, которые продуцируют этанол, а также ведет исследования по созданию промышленных штаммов *Clostridium ljungdahlii* и *Acetobacterium woodii* при помощи методов генной инженерии (Poehlein et al., 2025). Стоит отметить, что в Российской Федерации на данный момент не известны подобные разработки даже на уровне лабораторных исследований. Основная проблема в создании таких штаммов-продуцентов ценных химических соединений связана с тем, что хемолитоавтотрофный рост ацетогенных прокариот в присутствии H_2/CO_2, CO или же синтез-газа протекает за счет одноэтапных биохимических реакций, дающих очень малый выход энергии. В связи с этим ацетогенные штаммы, созданные методами генной инженерии для получения соединений, которые более восстановлены и сложны, чем ацетат, не отличаются высокой продуктивностью и скоростью роста, а следовательно, не подходят для биотехнологического применения. Увеличение энергетической эффективности ацетогенеза является одной из ключевых задач метаболической инженерии, так как только при достаточном количестве энергии можно получать эффективные штаммы-продуценты (Bengelsdorf et al., 2018; Müller, 2019). Одним из путей решения обозначенной проблемы является поиск новых, более эффективных механизмов запасания энергии у ацетогенных прокариот. Изучение такого скрытого метаболического потенциала ацетогенных микроорганизмов может быть осуществлено при работе как с коллекционными штаммами, так и с новыми культурами.

В природных местообитаниях, для которых, как правило, характерна очень низкая концентрация H_2, CO_2 и/или CO, энергетический выход ацетогенеза в хемолитоавтотрофных условиях будет ниже, чем ранее установленный предел в −20 кДж/моль, являющийся минимальным энергетическим выходом реакции, который может быть усвоен клеткой (так называемый биологический квант энергии) (Schink, 1997). По этой причине, а также по причине более низкой степени сродства к водороду у ацетогенных прокариот в сравнении с метаногенными археями и сульфатредуцирующими бактериями, в течение длительного времени считалось, что хемолитоавтотрофный рост ацетогенов является неконкурентным в природных местообитаниях (Drake et al., 2008; Schuchmann and Müller, 2014). Отчасти именно этим объяснялось отсутствие на момент начала диссертационной работы известных облигатно хемолитоавтотрофных ацетогенных прокариот, однако вопрос об их существовании оставался открытым. Получение чистых культур облигатно хемолитоавтотрофных ацетогенных прокариот свидетельствовало бы о наличии у таких микроорганизмов новых, более эффективных механизмов запасания энергии.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлся поиск облигатно автотрофных ацетогенных прокариот, способных получать энергию за счет метаболических реакций, ранее не показанных для ацетогенеза.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Получение чистых культур автотрофных ацетогенных прокариот из проб термальных местообитаний Российской Федерации.
2. Физиологическая и филогенетическая характеристика выделенных чистых культур автотрофных ацетогенных прокариот.
3. Оценка метаболического потенциала новых штаммов облигатно автотрофных ацетогенных прокариот на основании анализа их полных геномов.
4. Изучение ранее неизвестных особенностей энергетического метаболизма ацетогенных прокариот на примере новых облигатно автотрофных штаммов.

Научная новизна. Из образцов природных термальных местообитаний выделены первые облигатно автотрофные ацетогенные прокариоты, которые являются представителями двух новых родов и видов *Aceticella autotrophica* gen. nov., sp. nov. и *‘Acetitalea autotrophica’* gen. nov., sp. nov.

Для обоих организмов показан модульный принцип организации ацетогенеза, который предполагает наличие электронодонорных (окислительный модуль), электроноакцепторных (восстановительный модуль) и энергозапасающих (энергетический модуль) реакций.

Для *Ac. autotrophica* впервые показано, что путь Вуда-Льюнгдаля (ПВЛ) в восстановительном модуле ацетогенеза может быть частично замещен НАД(Ф)Н-зависимой сероредуктазой, осуществляющей футильный сброс электронов с НАД(Ф)Н на серу. Таким образом, впервые описан процесс «облегченного» ацетогенеза, в ходе которого сброс электронов осуществляется не только на CO_2, но и на серу. При этом окислительный модуль представлен бифуркационной гидрогеназой, а энергетический – мембраносвязанной энергозапасающей гидрогеназой (Ech-комплекс).

Для *‘At. autotrophica’* впервые показано, что восстановительный модуль ацетогенеза может быть представлен восстановительным глициновым путем, в то время

как энергетический модуль ацетогенеза – Nuo-подобным мембранным комплексом. Таким образом, впервые высказано предположение о существовании «глицинового» ацетогенеза.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты представленной работы дают новую информацию о биологическом разнообразии ацетогенных прокариот, а именно об их филогении и таксономии, физиологии и метаболизме. Выделение и последующая всесторонняя характеристика первых облигатно автотрофных ацетогенных прокариот, а также подробное изучение ранее неизвестных механизмов ацетогенеза позволяют приблизиться к пониманию процессов, обеспечивающих функционирование клетки в условиях дефицита энергии на термодинамическом пределе жизни, что, в свою очередь, поможет уточнить величину биологического кванта энергии. Детальное исследование метаболизма *Ac. autotrophica* и *'At. autotrophica'* создает научную основу для разработки высокоэффективных промышленных штаммов-продуцентов аминокислот, этанола, бутанола, гексанола, изопропанола, 2,3-бутандиола, бутирата и других соединений. При этом полученные в рамках диссертационной работы штаммы *Ac. autotrophica* и *'At. autotrophica'* являются перспективной платформой для создания штаммов-продуцентов подобных биотехнологически ценных соединений с помощью методов биоинженерии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Термальные экосистемы являются источником выделения новых штаммов ацетогенных прокариот, способных к хемолитоавтотрофному росту.
2. Выделенные микроорганизмы являются первыми облигатно автотрофными представителями ацетогенных прокариот и относятся к новым таксонам, представленным двумя новыми родами (*Aceticella* gen. nov. и *'Acetitalea'* gen. nov.).
3. Генетические детерминанты основных метаболических процессов, обнаруженные в ходе анализа геномов выделенных штаммов, соответствуют физиологическим данным, полученным при лабораторном культивировании. Ацетогенез у новых штаммов так же, как у всех ранее описанных ацетогенных прокариот, может быть рассмотрен как модульный процесс, состоящий из электронодонорных, электроноакцепторных и энергозапасающих реакций.
4. Восстановительный модуль ацетогенеза у *Ac. autotrophica* штамм 3443-3Ac^T может быть представлен НАД(Ф)Н-зависимой сероредуктазой, осуществляющей футильный сброс электронов с НАД(Ф)Н на серу и замещающей тем самым реакции пути Вуда-Льюнгдаля.
5. Восстановительный модуль ацетогенеза у *'At. autotrophica'* штамм 3819-GS1 вероятно представлен восстановительным глициновым путем, в то время как энергетический модуль может быть представлен мембранным Nuo-подобным комплексом.

Методы и методология исследования. Диссертационное исследование выполнялось с использованием классических и современных микробиологических, молекулярно-биологических и биоинформатических подходов, таких как получение накопительных и чистых культур микроорганизмов, их культивирование, изучение физиологии, метаболизма и ростовых характеристик, методы аналитической химии,

экстракция ДНК, полимеразная цепная реакция (ПЦР), таксономическое профилирование по фрагменту гена 16S рРНК и сравнительный анализ полногеномных последовательностей. Разнообразие использованных методик и перекрестное подтверждение результатов с их помощью свидетельствуют о достоверности и воспроизводимости полученных данных, при этом работа выполнена с использованием современного сертифицированного оборудования.

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы диссертации содержатся в 10 печатных работах, в том числе в 3-х экспериментальных статьях в журналах из Перечня ВАК РФ и международных реферативных баз данных Scopus и Web of Science и в 7 тезисах конференций. Материалы диссертационной работы были представлены на 3-м Российском микробиологическом конгрессе (Псков, Россия, 26 сентября–01 октября 2021 г.), XIII молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, Россия, 16–18 ноября 2022 г.), 4-м Российском микробиологическом конгрессе (Томск, Россия, 24–29 сентября 2023 г.), 14-ой Международной мультиконференции «Биоинформатика регуляции и структуры геномов / системная биология» (Новосибирск, Россия, 05–10 августа 2024 г.), 5-м Российском микробиологическом конгрессе (Волгоград, Россия, 29 сентября–03 октября 2025 г.), а также были доложены на ежегодных отчетных конференциях в рамках обучения в аспирантуре ФИЦ Биотехнологии РАН.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие во всех стадиях исследования, результаты которого изложены в данной работе. Соискателем проведен анализ данных таксономического профилирования микробных сообществ природных местообитаний и накопительных культур. Автором самостоятельно или при личном участии получены накопительные и чистые культуры хемолитоавтотрофных ацетогенных бактерий, определены их физиолого-биохимические и ростовые характеристики, выполнено таксономическое описание новых родов и видов, чьи типовые штаммы депонированы в международные коллекции микроорганизмов. Автор принимал непосредственное участие в анализе геномных данных, обработке и интерпретации результатов. Личный вклад соискателя также состоит в написании научной работы, статей и тезисов и представлении работы на научных конференциях.

Объем и структура диссертационной работы. Диссертация содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Текст диссертации изложен на 151 странице, включая 4 таблицы и 21 рисунок. Список литературы содержит 278 наименований, среди которых 3 на русском и 275 на иностранных языках.

Благодарности. Автор искренне благодарит научного руководителя, зав. лаб., к.б.н. Е.Н. Фролова, за всестороннюю поддержку на всех этапах подготовки диссертации, помощь в освоении новых методик исследований, постоянное внимание к работе и терпение. Соискатель благодарит к.б.н. А.А. Клюкину и к.б.н. А.Ю. Меркеля за подготовку библиотек для секвенирования V3-V4-участков гена 16S рРНК и помощь в обработке результатов, а также к.б.н. А.Г. Ельченинова за сборку геномов *de novo* и помощь в последующем филогенетическом анализе. Особую благодарность автор выражает к.б.н. А.В. Лебединскому за помощь с анализом геномных данных. Автор также выражает признательность к.х.н. А.А. Новикову, к.б.н. С.В. Тощакову,

Н.А. Кострикиной и А.В. Литвин за помощь на разных этапах проведения исследования. Автор выражает искреннюю признательность всему коллективу лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот за создание идеальной атмосферы для совместной плодотворной работы, за постоянную поддержку и помощь на протяжении всего времени выполнения диссертационной работы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись смешанные пробы воды и осадков термальных источников Курило-Камчатского региона (2019 г.) и Байкальской рифтовой зоны (БРЗ, 2024 г.), термальные воды Ессентукского месторождения минеральных вод (ЕММВ, 2022 г.), а также устойчивые накопительные и чистые культуры ацетогенных прокариот, полученные при работе с данными пробами. Характеристика источников и отобранных проб представлена в разделе «Результаты и их обсуждение». Кроме того, исследование выполнялось на чистой культуре штамма 3443-3Ac^{T}, выделенной сотрудником Лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот ФИЦ Биотехнологии РАН Е.Н. Фроловым. Материал для выделения штамма был получен из термального ручья Каскадный, расположенного в кальдере Узон на Камчатке (координаты: N54° 30′ 1.56″, E160° 00′ 22.44″, высота 658 м над уровнем моря) в ходе летней экспедиции 2015 года.

Культивирование ацетогенных бактерий осуществляли с использованием модифицированной среды Пфеннига (Pfennig, 1965). Среда с нейтральным и щелочным pH для проб с низкой минерализацией содержала (г/л): KH_2PO_4 (0,2), $MgCl_2{\cdot}2H_2O$ (0,1), NH_4Cl (0,5), KCl (0,2). Во все среды на 1 л дистиллированной воды вносили по 1 мл растворов витаминов (Wolin et al., 1963) и микроэлементов (Кевбрин, Заварзин, 1992). Все среды готовили анаэробно в атмосфере CO_2 или N_2. В качестве восстановителя вносили $Na_2S{\cdot}9H_2O$ в концентрации 1 г/л. Для контроля окислительно-восстановительного потенциала добавляли резазурин в конечной концентрации 1 мг/л. Для проверки зависимости культур от присутствия Na^+ в среде, вместо $Na_2S{\cdot}9H_2O$ в качестве восстановителя использовали раствор цистеина (3 мМ) в соляной кислоте. pH среды до необходимого значения доводили с помощью 6 N растворов HCl и NaOH. Готовую среду разливали под током CO_2 в пробирки Хангейта, заполняя их на 5 мл средой и оставляя 12 мл для газовой фазы, или в бутыли объемом 1 л, заполняя их 400 мл среды. При культивировании в двухлитровых бутылях их заполняли 1 л среды. Необходимую газовую фазу создавали до стерилизации. Растворимые субстраты и антибиотики добавляли непосредственно в пробирки после стерилизации, а нерастворимые субстраты вносили перед стерилизацией. Стерилизацию проводили в автоклаве при давлении 1 атм в течение 1 часа. Среду с элементной серой и полисульфидом подвергали автоклавированию при давлении 0,5 атм.

Ростовые субстраты и акцепторы электронов. Способность выделенных чистых культур утилизировать различные субстраты оценивали с использованием следующих органических соединений: глюкоза, фруктоза, галактоза, манноза, арабиноза, рамноза, ксилоза, рибоза, трегалоза, целлобиоза, лактоза, мальтоза, сахароза, раффиноза, сорбитол, маннитол (каждый в концентрациях 0,5, 2 и 5 г/л); формиат, ацетат, лактат, пируват, малат, пропионат, бутират, фумарат, цитрат,

сукцинат, тартрат, оксалат, этанол, метанол, пропанол, бутанол, изобутанол, глицерин (5, 20 и 40 мМ); 2-метоксифенол, 3,4-диметоксибензоат, 2-метоксибензоат, фосфит (1, 5 и 10 мМ); дрожжевой экстракт, мясной экстракт, пептон, триптон, крахмал, пектин, декстрин, ксилан, целлюлоза (0,2, 1 и 2 г/л). Культивирование с водородом в качестве донора электронов проводили в атмосфере газовой смеси H_2/CO_2 с соотношением компонентов 4:1. При использовании CO в качестве субстрата готовили серию газовых смесей, содержащих CO, H_2 и CO_2, где объемная доля CO варьировала от 1 до 50%. В роли акцепторов электронов в среду вносили элементную серу (10 г/л), а также растворы полисульфида (6 мМ), тиосульфата (10, 20 и 30 мМ), сульфата, нитрата, перхлората, фумарата, цитрата Fe(III) (10 мМ каждого), сульфита и нитрита (5 мМ).

Накопительные культуры хемолитоавтотрофных ацетогенных бактерий получали на селективных средах в атмосфере H_2/CO_2. Для выделения чистых культур применяли следующие методы: метод последовательных десятикратных разведений в жидкой среде, метод агаровых столбиков, селекцию по температуре культивирования.

Наблюдение за ростом и изучение морфологии клеток осуществляли с помощью **светового микроскопа** Olympus CX-41, оснащенного фазово-контрастным устройством. Исследование тонкого строения клеток выполняли совместно с к.б.н. Н.А. Кострикиной (ЦКП UNIQEM). Наблюдения проводили на **трансмиссионном электронном микроскопе** Jeol JEM-1400 (Jeol, Tokyo, Japan).

Определение количества сульфида проводили колориметрическим методом с N,N-диметил-п-фенилендиамином (Trüper and Schlegel, 1964).

Определение количества H_2, CO_2, CO осуществляли методом газовой хроматографии на хроматографе «Хроматэк Кристалл 5000.2». **Определение количества летучих жирных кислот** в образцах осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Agilent Infinity 1260-II (Agilent Technologies, США), оснащенном рефрактометрическим детектором. **Определение концентрации сульфат-, нитрат-, нитрит-, перхлорат- и хлорид-ионов** осуществляли методом ионной хроматографии на хроматографе «Стайер» (Аквилон, Россия) с колонкой IonPac AS4-ASC (Dionex, США) и кондуктометрическим детектором.

Профили жирных кислот клеточных мембран определяли в сотрудничестве с к.х.н. А.А. Новиковым, сотрудником РГУ нефти и газа им. И.М. Губкина. Для этого использовали метод газовой хроматографии-масс-спектрометрии.

Выделение ДНК из природных образцов и накопительных культур осуществляли с помощью наборов DNeasy PowerLyzer Microbial Kit (Qiagen, Германия) и FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, США) в соответствии с инструкцией производителя. Экстракцию ДНК чистых культур проводили по модифицированному протоколу с использованием фенол-хлороформной методики.

Таксономическое профилирование микробных сообществ было произведено сотрудниками Отдела биологии экстремофильных микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН А.А. Клюкиной и А.Ю. Меркелем Высокопроизводительное секвенирование библиотек проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные в ходе секвенирования прочтения анализировали с помощью сервиса SILVAngs (база данных SILVA138.2,

Version: 1.9.10/1.4.9). **Определение полных последовательностей геномов чистых культур** осуществляли при помощи гибридного секвенирования на приборах Illumina HiSeq2500 (Illumina, США) и MinION (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания).

Филогенетический анализ проводили на основе набора из 120 консервативных маркерных белков (bac120; Parks et al., 2020). Построение филогенетических деревьев осуществляли в программе RAxML версии 8.2.12 (Stamatakis, 2014) с использованием модели замен PROTGAMMAILG. Статистическую поддержку узлов дерева оценивали методом бутстрэп-анализа (1000 повторов).

Анализ приобретения и утраты генов выполняли с помощью программы Count (Csurös, 2010). В качестве референсного дерева использовали укороченную версию филогенетического древа, построенного на основе набора белков bac120. Все белки, участвовавшие в анализе, были представлены в виде их идентификаторов кластеров ортологичных генов (COG), присвоенных в ходе аннотации в системе IMG. Оптимизацию параметров в программе Count проводили со стандартными настройками.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Накопительные культуры хемолитоавтотрофных ацетогенных бактерий

Устойчивые накопительные и чистые культуры хемолитоавтотрофных ацетогенных микроорганизмов были получены при работе с пробами, отобранными из горячих источников кальдеры Узон (Камчатка) и БРЗ (Бурятия), а также подземной биосферы ЕММВ.

В микробных сообществах 10 образцов горячих источников, отобранных в **кальдере Узон**, ацетогенные бактерии присутствовали в качестве минорных компонентов. В ходе их изучения удалось получить 5 устойчивых накопительных культур, среди которых 3 содержали значительное количество микроорганизмов, которые осуществляли хемолитоавтотрофный ацетогенез и характеризовались неопределенным филогенетическим положением в семействах *Thermoanaerobacteraceae* и *Neomoorellaceae* (Рисунок 1). Из накопительной культуры 3819_Enrich, содержавшей большую долю представителей семейства *Neomoorellaceae*, при помощи последовательных 10-кратных разведений и повышения температуры инкубации до 70 °C была получена чистая культура штамма 3819-GS1.

Проба 75-бис была получена в ходе пропускания через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм 100 л воды, добываемой с помощью **скважины 75-бис ЕММВ**. Скважина 75-бис характеризуется газовым фактором (отношение объема добытого скважиной газа к объему добытой воды, $м^3/м^3$), равным 16,3, причем концентрация CO_2 в газовой фазе составляет 99,44%. Микробное сообщество водоносного горизонта скважины 75-бис имело стабильный состав на протяжении 3 лет отбора проб (сентябрь 2020 – апрель 2022 г.) и отличалось чрезвычайно низким разнообразием прокариот (Рисунок 1). Более 90% сообщества было представлено бактериями неопределенного таксономического положения в семействе *Thermoanaerobacteraceae*, в то время как остальная часть сообщества включала различных бактерий с долей в сообществе менее 1%. Создание селективных условий (H_2/CO_2 (4:1), pH 6,0 и 50 °C) после двух последовательных пересевов и последующих последовательных десятикратных разведений позволило получить чистую культуру штамма 75b-Ac.

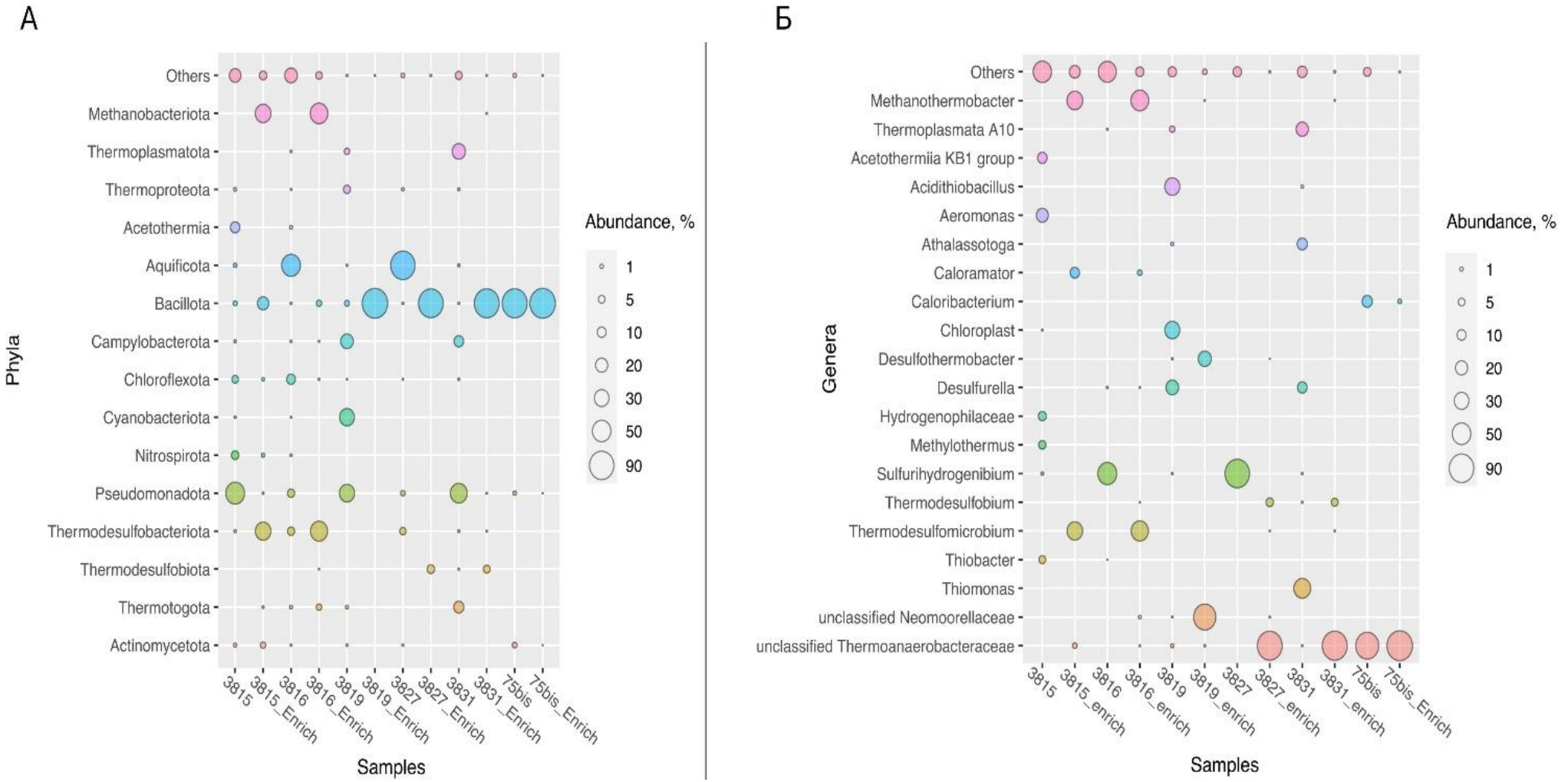


Рисунок 1 – Микробное разнообразие горячих источников кальдеры Узон и скважины 75-бис Ессентукского месторождения минеральных вод, а также полученных накопительных культур: (А) относительная численность таксономических групп прокариот на уровне филумов; (Б) относительная численность таксономических групп прокариот на уровне родов. Others – таксоны прокариот, относительная численность которых составляет ≤5% от всех прокариот хотя бы в одном образце.

В ходе изучения 9 образцов горячих источников, отобранных в **БРЗ**, были поставлены накопительные культуры на среде с H_2/CO_2 (4:1) в газовой фазе, pH 8,0 и инкубацией при 42 °C. В результате удалось получить 1 устойчивую накопительную культуру из пробы № 4704. Однако анализ состава микробного сообщества этой накопительной культуры показал, что в данных условиях произошло накопление различных групп бактерий, а именно сульфатредукторов и хемоорганотрофов, и метаногенных архей, но не ацетогенных бактерий.

2. Описание новой ацетогенной бактерии *Aceticella autotrophica* gen. nov., sp. nov.

Из пробы осадков наземного термального ручья Каскадный (N54° 30.026′ E160° 00.374′, 658 м) Восточного термального поля кальдеры Узон (Камчатка) была выделена чистая культура ацетогенной бактерии **штамм 3443-3Ac^T**. Выделение чистой культуры осуществляли на восстановленной сульфидом среде с использованием H_2 в качестве донора электронов и HCO_3^-/CO_2 – в качестве источника углерода и акцептора электронов, pH среды 6,0, температура инкубации 55 °C.

Клетки штамма 3443-3Ac^T имели палочковидную форму и в зависимости от фазы роста и условий культивирования располагались одиночно, парами или в цепочках. Подвижности не наблюдалось, жгутики выявлены не были (Рисунок 2А). Штамм 3443-3Ac^T был способен к спорообразованию и имел клеточную стенку грамположительного типа (Рисунок 2Б).

Штамм 3443-3Ac^T являлся строго анаэробным микроорганизмом, рост которого наблюдался в интервале температур 30–60 °C с оптимумом при 46–50 °C. Увеличение продолжительности культивирования до 10 суток не приводило к появлению роста при 22 °C и ниже, а также при 65 °C и выше. Диапазон pH для роста находился в пределах 4,5–7,3 с оптимумом при pH 6,0. Рост не был показан при значениях pH 4,3 и ниже, а также при pH 7,5 и выше.

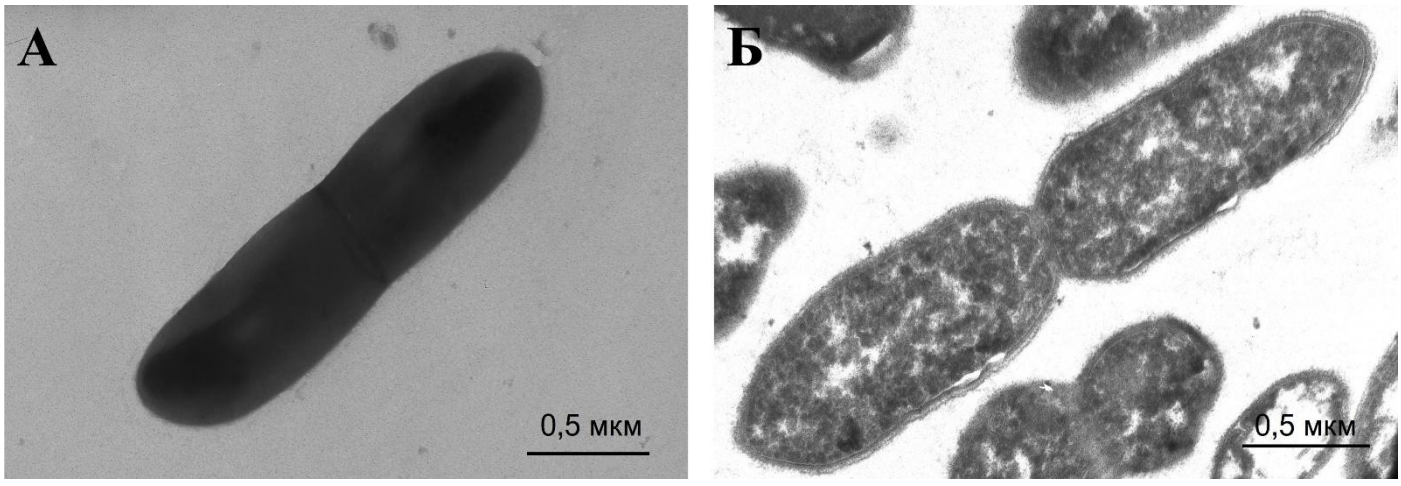


Рисунок 2 – Морфология и ультраструктура клеток *Aceticella autotrophica* 3443-3Ac^T: (А) электронная микроскопия, препараты целых клеток (окраска фосфовольфрамовой кислотой); (Б) электронная микроскопия, ультратонкие срезы (окраска уранилацетатом).

Культура росла при концентрациях NaCl до 1,5%, однако оптимальной для роста оказалась исходная базовая среда, где концентрации Na^+ и Cl^- составляли 0,1% и 0,06% соответственно. При концентрации NaCl 2% и выше рост отсутствовал. Штамм 3443-3Ac^T также рос на среде, не содержащей витаминов, однако выход биомассы и скорость

роста снижались приблизительно на 30% по сравнению с контролем. Время удвоения при культивировании в оптимальных условиях (температура 60 °C, pH 6,0, без дополнительного внесения NaCl, с добавлением витаминов) составляло 4,5 часа.

Штамм 3443-3Ac^{T} оптимально рос в хемолитоавтотрофных условиях в присутствии H_2 в качестве донора электронов и HCO_3^-/CO_2 в качестве источника углерода и акцептора электронов (Рисунок 3А). Единственным конечным продуктом метаболизма в данных условиях являлся ацетат. Помимо водорода, исследуемый штамм был способен утилизировать формиат (25 мМ), однако выход биомассы в этом случае был ниже по сравнению с ростом на H_2. Скорость роста при этом не изменялась (Рисунок 3Б). При росте на формиате основными продуктами являлись ацетат и CO_2, при этом фиксировалось также образование незначительных количеств H_2. Соотношение поглощенного формиата и образованного ацетата составляло 4,2:1. Количество образуемого H_2 достигало максимальных значений (1 мМ) в экспоненциальной фазе роста, тогда как при переходе культуры в стационарную фазу этот показатель снижался до 0,5 мМ.

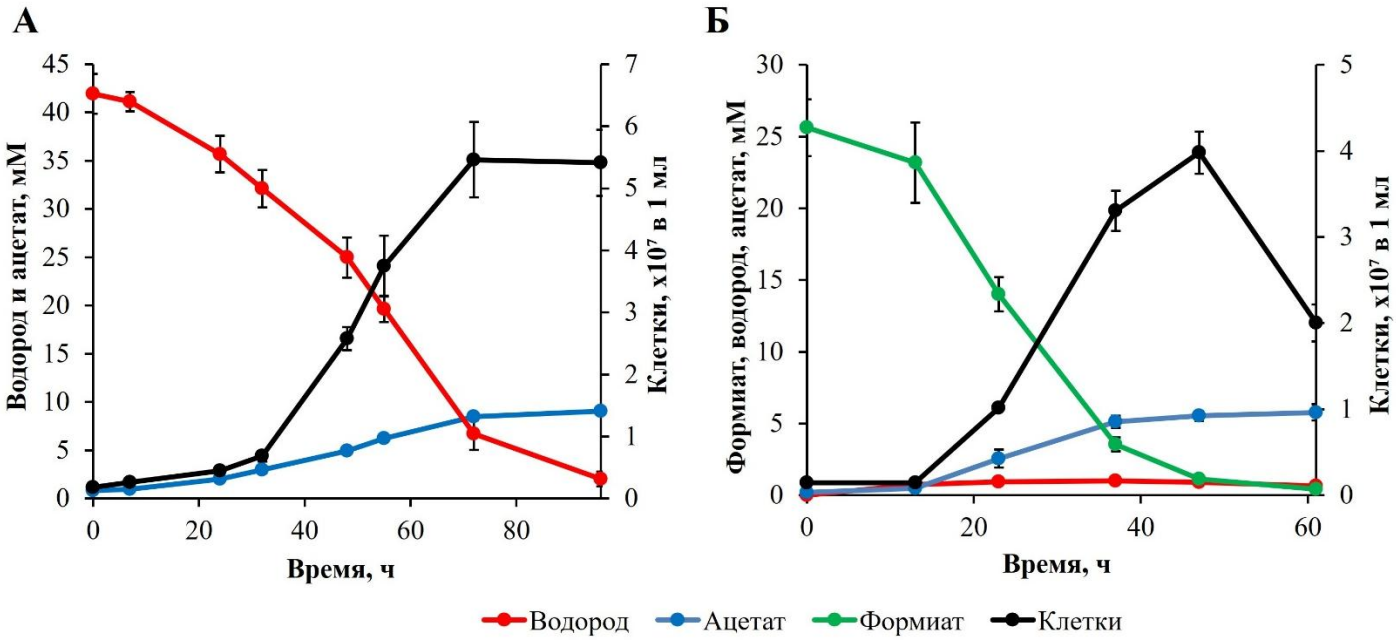


Рисунок 3 – Рост и образование ацетата штаммом 3443-3Ac^{T} при 50 °C и pH 6,0 (А) в присутствии H_2 и CO_2 и (Б) в присутствии формиата в среде. На графиках отражены результаты, полученные вычислением среднего значения из трех повторностей.

Адаптация к росту на CO проводилась по методике, описанной ранее для *T. kivui* (Weghoff and Müller, 2016) в присутствии и в отсутствие S^0. Клетки, предварительно выращенные на H_2/CO_2, переносили в среду, газовая фаза которой содержала 1% CO (в присутствии 49% H_2 и 50% CO_2). Путем ступенчатого повышения концентрации CO (до 5% – с шагом 1%, до 20% – с шагом 5%, до 30% – с шагом 10%) удалось адаптировать штамм 3443-3Ac^{T} к росту в атмосфере, содержащей 20% CO, 30% H_2 и 50% CO_2, но только в присутствии S^0. Также в присутствии S^0 удалось адаптировать культуру к росту на газовой смеси, приближающейся по составу к синтез-газу (Hos and Herskowitz, 2021) и содержащей 20% CO, 60% H_2 и 20% CO_2. Основным продуктом метаболизма при росте на газовой смеси такого состава являлся ацетат. Удельная скорость роста в

присутствии CO составляла 0,0063 $ч^{-1}$, а в отсутствие CO (контроль) – 0,0284 $ч^{-1}$, что коррелировало с наличием продолжительной лаг-фазы в первом случае (Рисунок 4). Урожай клеток в присутствии CO также был значительно ниже контроля и максимальное значение составляло 2×10^7 клеток в 1 мл культуры.

Скрининг широкого спектра субстратов показал, что штамм 3443-3Ac^T не способен утилизировать органические соединения. Рост отсутствовал на средах, содержащих дрожжевой экстракт, мясной экстракт, пептон, пектин, декстрин, крахмал, целлюлозу, ксилан (в концентрациях 0,2, 1 и 2 г/л каждого), а также на моно- и дисахаридах, таких как глюкоза, фруктоза, галактоза, манноза, арабиноза, рамноза, ксилоза, рибоза, трегалоза, целлобиоза, сахароза, лактоза, мальтоза, раффиноза (0,5, 2 и 5 г/л). Кроме того, культура не метаболизировала сахарные спирты (сорбитол, маннитол; 0,5, 2 и 5 г/л), органические кислоты (ацетат, лактат, пируват, малат, пропионат, бутират, фумарат, сукцинат, цитрат; 5, 20 и 40 мМ), спирты (этанол, пропанол, метанол; 5, 20 и 40 мМ), глицерин (5, 20 и 40 мМ), а также ароматические соединения (2-метоксифенол, 3,4-диметоксибензоат, 2-метоксибензоат; 1, 5 и 10 мМ).

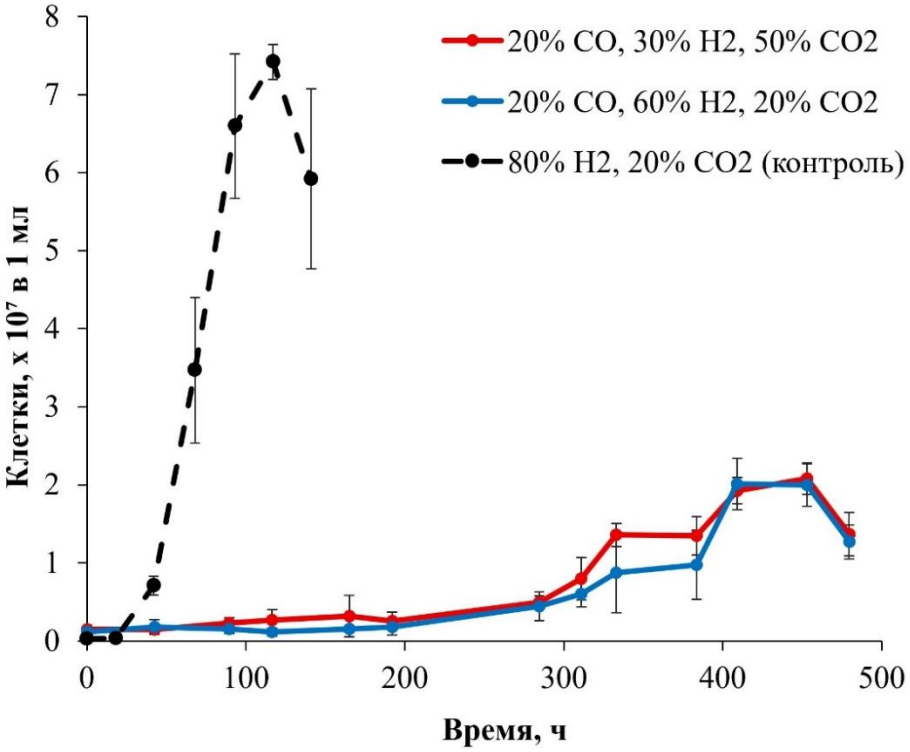


Рисунок 4 – Рост штамма 3443-3Ac^T на среде в присутствии элементной серы и в атмосфере, содержащей 20% CO. На графиках отражены результаты, полученные вычислением среднего значения из трех повторностей.

При культивировании в присутствии H_2 или формиата штамм 3443-3Ac^T не проявлял способности использовать в качестве акцепторов электронов нитрат, сульфат, тиосульфат, перхлорат, фумарат, цитрат Fe(III) (в концентрации 10 мМ каждого), нитрит, сульфит (5 мМ) или молекулярный кислород (2 и 5% в газовой фазе). При добавлении в среду элементной или аморфной серы (10 г/л) в присутствии H_2/CO_2 или формиата наблюдалось образование сульфида, при этом происходило снижение количества образовавшегося ацетата (Рисунок 5). По сравнению с контрольными условиями без

добавления серы удельная скорость роста увеличивалась на 20%, а урожай клеток – почти на 80%.

Анализ генома штамма 3443-3Ac^T выявил наличие полного набора генов, кодирующих белки, необходимые для хемолитоавтотрофного ацетогенного роста с использованием H_2 (Рисунок 6А). Окислительный модуль ацетогенеза представлен бифуркационной [FeFe]-гидрогеназой HydABC, осуществляющей восстановление НАД$^+$ и $Fd_{окисл}$ в эквимолярном соотношении при окислении H_2. Восстановительный модуль представлен реакциями ПВЛ, а энергетический – H^+-зависимым Ech-комплексом и протонной АТФ-синтазой. Причем геном штамма 3443-3Ac^T не содержал генетических детерминант, кодирующих другие известные первичные генераторы трансмембранного потенциала.

Что касается метаболизма формиата, в геноме штамма 3443-3Ac^T не обнаружено генов, гомологичных известным транспортерам формиата. Согласно предлагаемой схеме, формиат поступает в клетку исследуемого штамма в ходе диффузии незаряженной формы субстрата через мембрану. Из 4 молекул формиата, вовлеченных в метаболизм, 3 окисляются H_2-зависимой CO_2-редуктазой (HDCR) до CO_2 и H_2, тогда как одна молекула формиата преобразуется в формил-ТГФ и далее восстанавливается до метил-ТГФ в метильной ветви ПВЛ. В карбонильной ветви CO_2 восстанавливается до CO, который затем взаимодействует с метильной группой при участии комплекса СОДГ/АКС, что приводит к образованию ацетил-КоА и далее ацетата.

Баланс восстановительных эквивалентов достигается за счет скоординированной работы трех ферментных систем: HDCR, HydABC и Ech-комплекса. HydABC окисляет H_2, продуцируемый HDCR и Ech-комплексом, восстанавливая $Fd_{окисл}$ и НАД$^+$, тогда как Ech-комплекс окисляет часть $Fd_{восст}$, сопрягая этот процесс с образованием H_2 и генерацией хемиосмотического градиента.

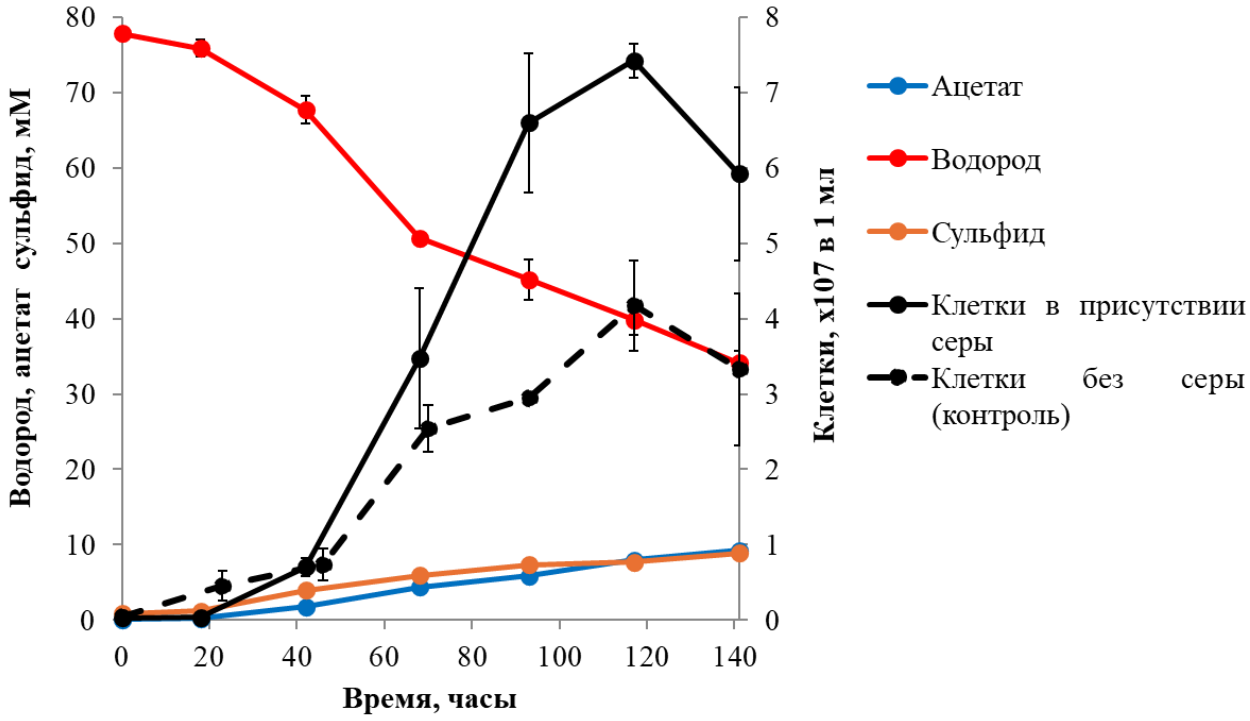


Рисунок 5 – Рост штамма 3443-3Ac^T в присутствии H_2/CO_2 и S^0 в среде. На графиках отражены результаты, полученные вычислением среднего значения из трех повторностей.

В геноме штамма 3443-3Ac^T выявлено два гена, кодирующих CO-дегидрогеназу (СОДГ). На основе гомологии было установлено, что ген ACETAC_10650 кодирует СОДГ-компонент в составе комплекса СОДГ/ацетил-КоА синтазы, тогда как ген ACETAC_02795 отвечает за синтез монофункциональной СОДГ. При росте на CO окисление CO под действием монофункциональной СОДГ сопровождается восстановлением $Fd_{окисл}$, который затем реокисляется комплексом Ech с образованием H_2 и созданием хемиосмотического градиента. Предполагается, что часть образующегося H_2 используется HDCR для восстановления CO_2 до формиата, а другая часть окисляется HydABC, обеспечивая синтез НАДН, необходимого для функционирования метильной ветви ПВЛ. CO и формиат далее преобразуются в ацетат через реакции ПВЛ.

В ходе анализа генома штамма 3443-3Ac^T не было идентифицировано генов, гомологичных известным сероредуктазам. Однако присутствовал ген ACETAC_00860, чей продукт демонстрировал 45% сходства с аминокислотной последовательностью недавно охарактеризованной НАД(Ф)Н:полисульфид-оксидоредуктазы (NSR) из *Thermotoga maritima*, участвующей у данной бактерии в футильном сбросе электронов с НАД(Ф)Н на серу, полисульфид и тиосульфат и обеспечивающей так называемое «облегченное» брожение (Liang et al., 2022). Обнаружение гомолога NSR в геноме штамма 3443-3Ac^T, отсутствие в нем генов, кодирующих альтернативные энергопреобразующие комплексы, а также отсутствие в клетках микроорганизма хинонов позволили предположить, что в восстановлении серных соединений у изучаемого ацетогена принимает участие продукт гена ACETAC_00860 (Рисунок 6Б). Он осуществляет НАД(Ф)Н-зависимое восстановление S^0 и полисульфида, обеспечивая тем самым футильный сброс электронов. Такая реакция приводит к увеличению доли $Fd_{восст}$ в клетке, в результате чего повышается эффективность работы Ech-комплекса и увеличивается выход АТФ. Для такого процесса предложен термин «облегченный» ацетогенез.

На основании фенотипических, генотипических и филогенетических (Рисунок 7) характеристик был сделан вывод о том, что штамм 3443-3Ac^T представляет новый вид нового рода, а также было предложено название *Aceticella autotrophica* gen. nov., sp. nov.

Все представители родственных штамму 3443-3Ac^T родов *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacter* и *Caldanaerobacter* (группа TTC) являются хемоорганогетеротрофными бактериями, растущими за счет брожения сахаров. Штамм 3443-3Ac^T, таким образом, представляет собой исключение, поскольку, согласно имеющимся данным, это первый облигатный автотроф в составе группы TTC. Анализ генома показал, что гены, кодирующие ферменты гликолиза/глюконеогенеза, присутствуют в геномах всех представителей группы TTC, включая штамм 3443-3Ac^T. Анализ приобретения и утраты генов в пределах филогенетической группы TTC выявил значительное сокращение числа генов, связанных с углеводным обменом, у штамма 3443-3Ac^T, тогда как общее количество кластеров ортологичных генов (COG) было сопоставимо с таковым у других представителей кластера TTC (Рисунок 8). *T. kivui* DSM 2030, являвшийся единственным ацетогеном в группе TTC, помимо штамма 3443-3Ac^T, демонстрировал сходный профиль утрат генов, однако в случае *T. kivui* эти потери не оказались критическими для способности усваивать сахара.

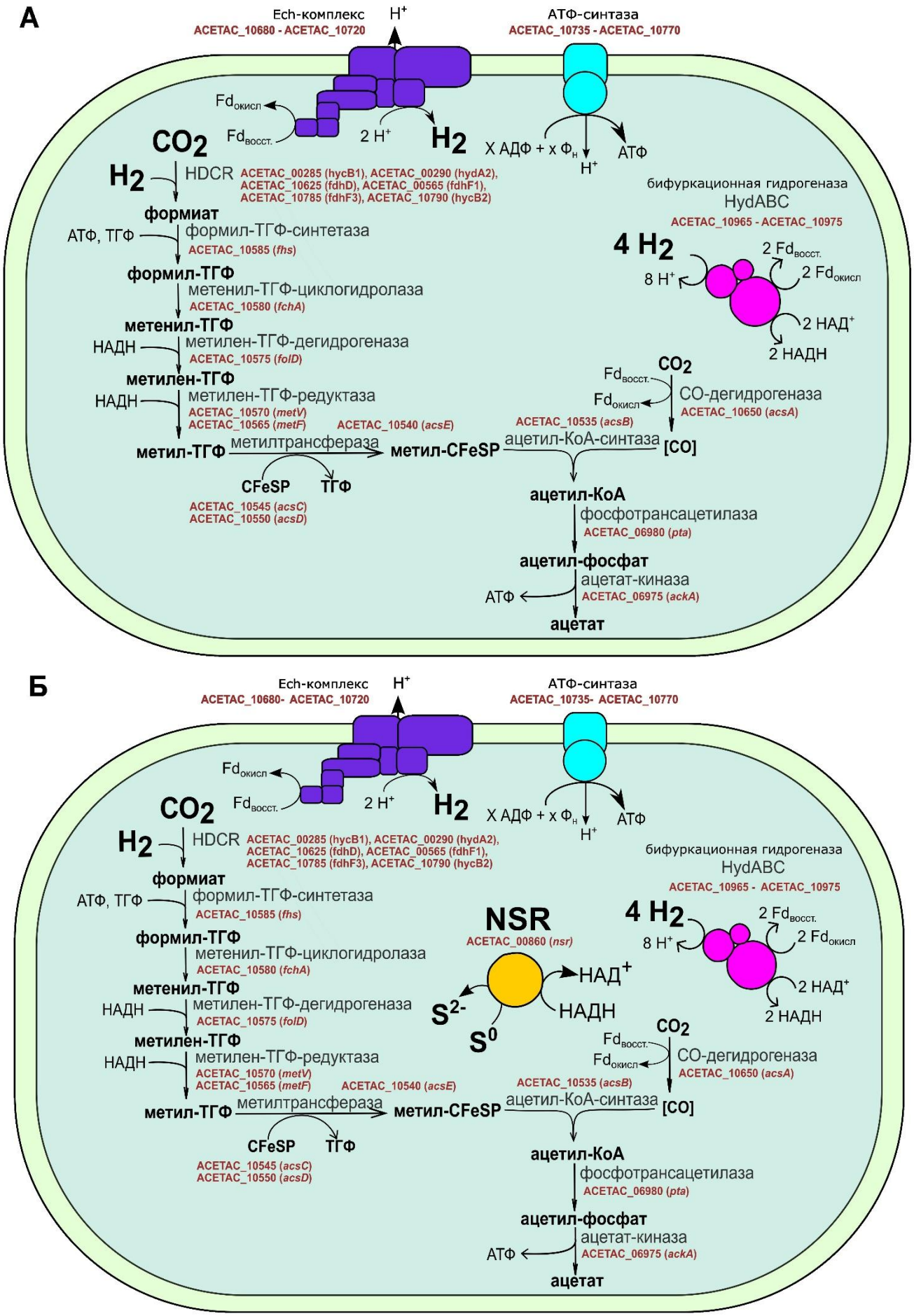


Рисунок 6 – Модель ацетогенеза штамма 3443-3Ac^T при росте на (А) H_2/CO_2. и (Б) H_2/CO_2 и S^0. NSR - НАД(Ф)Н:полисульфид-оксидоредуктаза.

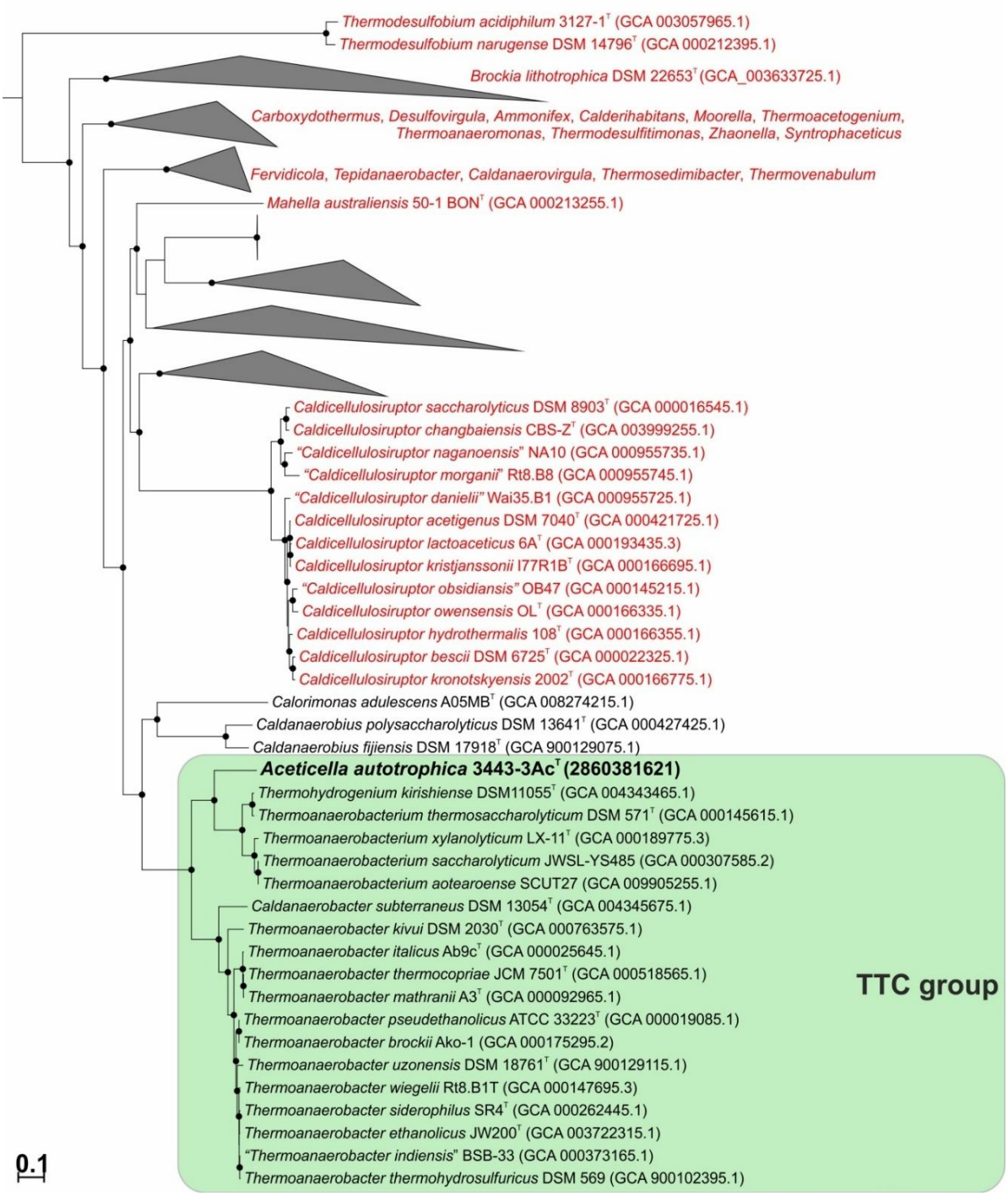


Рисунок 7 – Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия на основе набора белков bac120. Показано положение штамма 3443-3Ac^T (выделен жирным шрифтом) среди родственных таксонов. Виды *Thermoanaerobacterales*, которые были ошибочно классифицированы и должны быть отнесены к другим группам, обозначены красным цветом. Узлы, отмеченные черными кружками, имеют значения бустрэп-поддержки выше 50%. В качестве внешней группы использован *Melioribacter roseus* P3M-2^T (на рисунке не показан)

Количество уникальных потерь у штамма 3443-3Ac^T оказалось значительно больше, чем у *T. kivui*, причем эти потери затрагивали предполагаемые сахар-специфичные или неохарактеризованные транспортные системы, гликозилгидролазы и некоторые другие ферменты, действующие на углеводы. Среди парных потерь, общих для штамма 3443-3Ac^T и *T. kivui*, присутствовали гены, кодирующие различные сахароспецифичные транспортеры, ферменты, вовлеченные в обмен углеводов, ферменты метаболизма галактозы. Окислительная ветвь пентозофосфатного пути у

обоих организмов нарушена в связи с утратой фосфоглюконолактоназы, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (декарбоксилирующей), а у штамма 3443-3Ac^T – также глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (уникальная потеря для данного штамма). Следовательно, неспособность штамма 3443-3Ac^T использовать сахара в качестве субстратов для роста, по-видимому, связана с утратой систем транспорта углеводов и ферментов их расщепления.

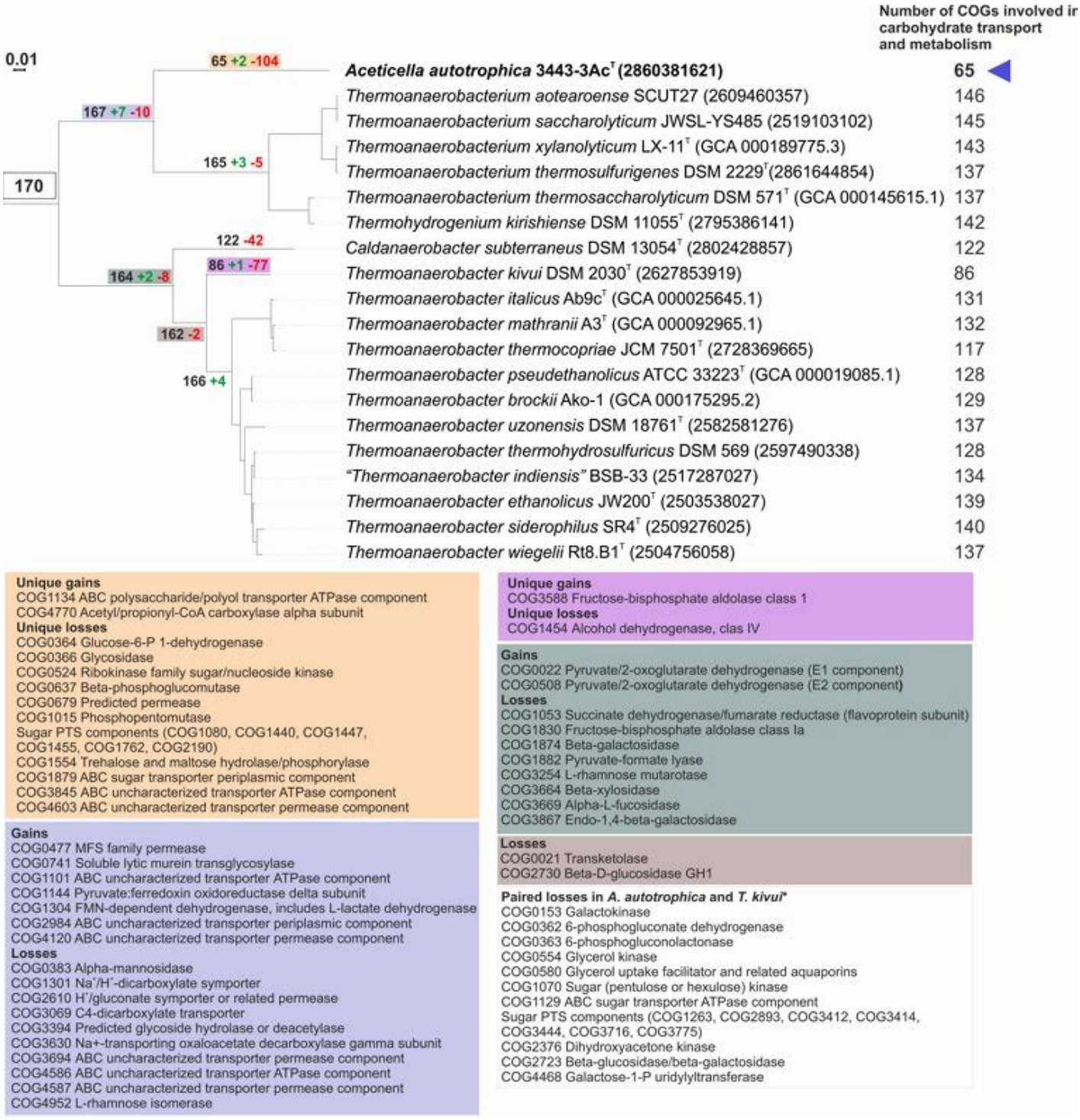


Рисунок 8 – Анализ утрат и приобретений генов, задействованных в транспорте и метаболизме углеводов, в геномах представителей группы ТТС (включая штамм 3443-3Ac^T). Цветными блоками отмечены перечни утраченных/приобретенных генов и соответствующие узлы на филогенетическом дереве. *Гены, утраченные параллельно у штамма 3443-3Ac^T и *T. kivui*, но сохранившиеся у остальных представителей группы ТТС. Функции белков приведены в соответствии с официальной номенклатурой COG (Цитировано по Frolov et al., 2023).

Штамм 75b-Ac был получен из пробы скважины 75-бис ЕММВ. Сравнение полной последовательности гена 16S рРНК данного штамма с последовательностями из баз данных показало сходство 99,62% с последовательностью штамма 3443-3Ac^T, выделенного ранее из горячего источника кальдеры Узон.

Клетки штамма 75b-Ac из ЕММВ были одиночными неподвижными палочками. Штамм 75b-Ac являлся облигатным анаэробом, оптимальные условия его роста составляли 50 °C и pH 6,0, что соответствовало оптимуму, установленному для штамма 3443-3Ac^T. Микроорганизм из ЕММВ осуществлял хемолитоавтотрофный ацетогенез, используя H_2 в качестве донора электронов и CO_2 в качестве акцептора электронов. Единственным продуктом метаболизма штамма 75b-Ac был ацетат. Анализ генома штамма 75b-Ac также показал функционирование механизма ацетогенеза, аналогичного описанному для штамма 3443-3Ac^T. Значения средней нуклеотидной идентичности (ANI) и средней аминокислотной идентичности (AAI), которые были рассчитаны для штаммов 3443-3Ac^T и 75b-Ac, а также для генома MAG_Yes75-02, собранного из метагенома микробного сообщества пробы 75-бис, показали высокую степень сходства: ANI 97,04–99,92%, AAI 96,26–99,96%. Изложенные факты, а также филогенетический анализ на основе набора консервативных белков bac120, позволили установить принадлежность штамма 75b-Ac к роду *Aceticella*.

3. Описание новой ацетогенной бактерии '*Acetitalea autotrophica*' gen. nov., sp. nov.

Из пробы Нефтяной площадки (N54° 30′ 0.84″ E160° 00′ 3.27″) Восточного термального поля кальдеры вулкана Узон (полуостров Камчатка, Россия) была выделена чистая культура ацетогенной бактерии **штамм 3819-GS1**. Выделение чистой культуры осуществлялось в восстановленной сульфидом среде с использованием H_2 в качестве донора электронов, а HCO_3^-/CO_2 – в качестве источника углерода и акцептора электронов. Значение pH среды составляло 6,0, а температура инкубации – 70 °C.

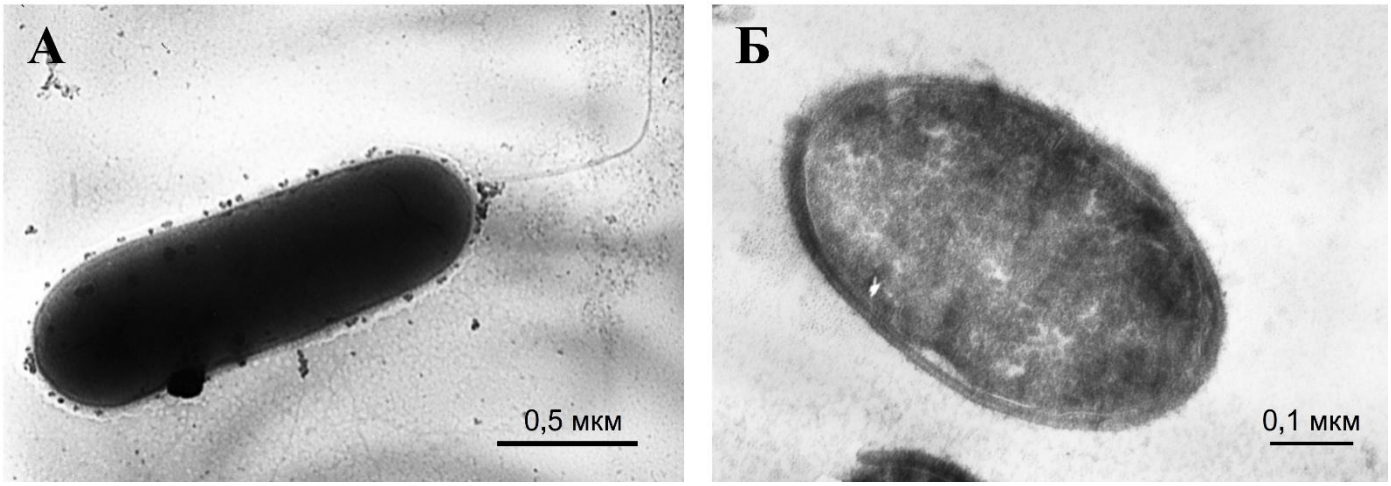


Рисунок 9 – Морфология и ультраструктура клеток '*Acetitalea autotrophica*' 3819-GS1: (А) электронная микроскопия, препараты целых клеток (окраска фосфовольфрамовой кислотой); (Б) электронная микроскопия, ультратонкие срезы (окраска уранилацетатом).

Клетки штамма 3819-GS1 имели палочковидную форму и располагались одиночно. Подвижность наблюдалась в экспоненциальной фазе роста, было показано наличие 1 жгутика (Рисунок 9А). Штамм 3819-GS1 формировал круглые терминальные эндоспоры и имел клеточную стенку грамположительного типа (Рисунок 9Б).

Штамм 3819-GS1 являлся строгим анаэробом. Способность к росту проявлялась в интервале температур 47–75 °C, причем максимальные значения скорости роста достигались в диапазоне 65–70 °C. Увеличение продолжительности культивирования до 14 суток не приводило к появлению роста при 37 °C и ниже, а также при 80 °C и выше. Диапазон pH для роста штамма 3819-GS1 находился в пределах 6,0–8,5 с оптимумом при pH 7,0. Рост не наблюдался при значениях pH 5,5 и ниже, а также при pH 9,0 и выше. Культура росла при концентрациях NaCl до 1,5%, однако оптимальной для роста оказалась исходная базовая среда, где концентрации Na^+ и Cl^- составляли 0,1% и 0,06% соответственно. Критической концентрацией, полностью ингибирующей рост, являлось содержание NaCl 2% и более. Штамм 3819-GS1 проявлял способность к развитию на среде, не содержащей витаминов. Время удвоения при культивировании в оптимальных условиях (температура 65 °C, pH 7,0, без дополнительного внесения NaCl) составляло 15 часов.

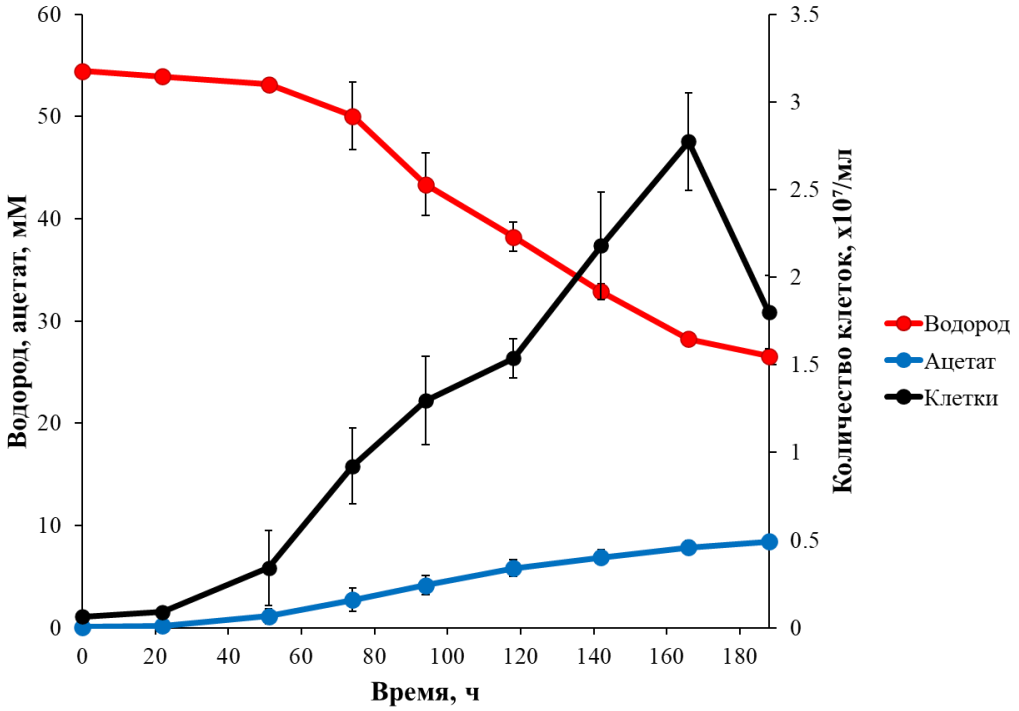


Рисунок 10 – Рост и образование ацетата штаммом 3819-GS1 при 65 °C и pH 7,0 в присутствии H_2 и CO_2. На графике отражены результаты, полученные вычислением среднего значения из трех повторностей.

Скрининг широкого спектра соединений показал, что штамм 3819-GS1 не был способен утилизировать органические субстраты и оптимально рос лишь в хемолитоавтотрофных условиях в присутствии H_2 в качестве донора электронов и HCO_3^-/CO_2 в качестве источника углерода и акцептора электронов (Рисунок 10). Единственным конечным продуктом метаболизма в данных условиях являлся ацетат. Рост отсутствовал на средах, содержащих дрожжевой экстракт, мясной экстракт, пептон, крахмал, ксилан (в концентрациях 0,2, 1 и 2 г/л каждого), а также на моно- и дисахаридах, таких как глюкоза, фруктоза, манноза, мальтоза, сахароза, галактоза, ксилоза, лактоза, арабиноза, целлобиоза, рибоза (0,5, 2 и 5 г/л). Кроме того, культура не метаболизировала серин, глицин, ацетат, лактат, пируват, малат, пропионат, бутират, фумарат, сукцинат, цитрат, этанол, пропанол, изопропанол, глицерин, метанол (5, 20 и

40 мМ), а также метоксилированные ароматические соединения, такие как 2-метоксифенол, 3,4-диметоксибензоат, 2-метоксибензоат (1, 5 и 10 мМ). Штамм 3819-GS1 не был способен использовать в качестве альтернативных акцепторов электронов S^0 (10 г/л), тиосульфат, сульфат, сульфит, нитрит, нитрат, перхлорат (10 мМ каждого).

Сравнительный анализ последовательности гена 16S рРНК штамма 3819-GS1 с нуклеотидными последовательностями генов валидно опубликованных микроорганизмов, проведенный с использованием алгоритма BLASTn, выявил 89–91% гомологии с представителями рода *Thermanaeromonas*. В ходе филогенетической реконструкции, выполненной на основании набора белков bac120 с привлечением базы данных GTDB, было установлено, что штамм 3819-GS1 формирует обособленную филогенетическую линию, соответствующую уровню рода в составе класса c__Moorellia (филум Bacillota) (Рисунок 11). Таким образом, на основании фенотипических, генотипических и филогенетических характеристик был сделан вывод о том, что штамм 3819-GS1 представляет новый вид нового рода, а также было предложено название *'Acetitalea autotrophica'* gen. nov., sp. nov.

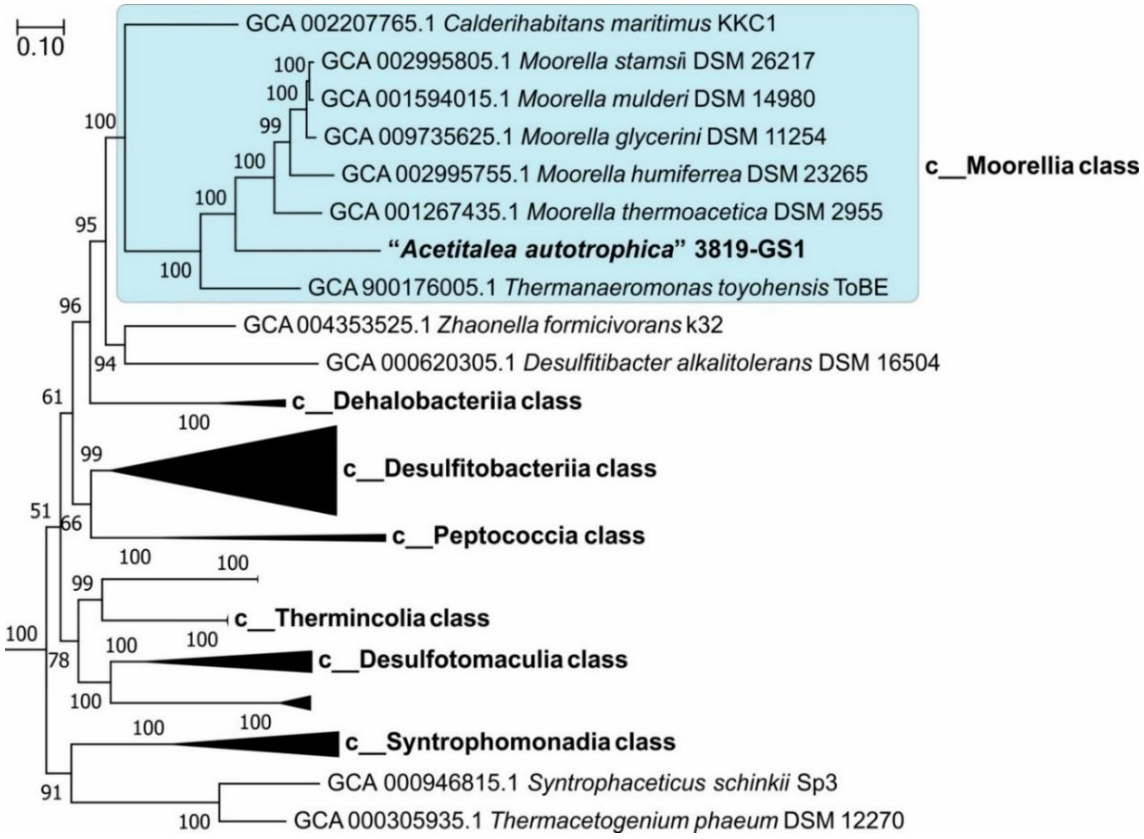


Рисунок 11 – Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия на основе набора консервативных белков bac120. Показано положение штамма 3819-GS1 (выделен жирным шрифтом) среди родственных таксонов. Цифры в узлах показывают значения бутстрэп-поддержки. Масштаб: 0,1 замена на аминокислотную позицию с поправками, рассчитанными моделью. В качестве внешней группы использован *Melioribacter roseus* P3M-2^T (на рисунке не показан). Название рода *Moorella* на данном рисунке соответствует новому валидному названию *Neomoorella* (Gtari and Ventura, 2025).

Геномный анализ показал, что окислительный модуль ацетогенеза у штамма 3819-GS1 представлен бифуркационной гидрогеназой HydABCD (Рисунок 12). Однако в геноме штамма 3819-GS1 не было идентифицировано генов, кодирующих ферменты

ПВЛ, являющегося классическим для восстановительного модуля ацетогенеза. Вместо этого геном содержал полный набор генов, кодирующих ферменты восстановительного глицинового пути, который, подобно ПВЛ у типичных ацетогенов, выполняет как функцию фиксации углекислоты для конструктивного метаболизма, так и функцию сброса электронов на CO_2. Анализ генома штамма 3819-GS1 показал отсутствие генов, кодирующих как Rnf-, так и Ech-комплексы, а единственным обнаруженным мембранным комплексом, способным выполнять роль первичного генератора электрохимического потенциала, был 11-субъединичный комплекс *nuoABCDHIJKLMN* (ABQ270_06700 – ABQ270_06750). При этом в геноме отсутствовали гены *nuoEFG*, кодирующие N-модуль данного комплекса, ответственный за окисление НАДН. Предполагается, что такой Nuo-подобный комплекс (без NuoEFG) принимает участие в окислении восстановленного ферредоксина, при этом в качестве акцептора могут выступать как хиноны, так и растворимые соединения, как правило, содержащие дисульфидные связи в своей последовательности (Chadwick et al., 2018; Yu et al., 2018, 2021). В настоящее время для штамма 3819-GS1 остается открытым вопрос о пути регенерации восстановленного тиоредоксина, необходимого для функционирования глицинредуктазного комплекса. Предположительно, 11-субъединичный мембранный комплекс осуществляет окисление $Fd_{восст}$, сопряженное с восстановлением тиоредоксина и генерацией мембранного потенциала.

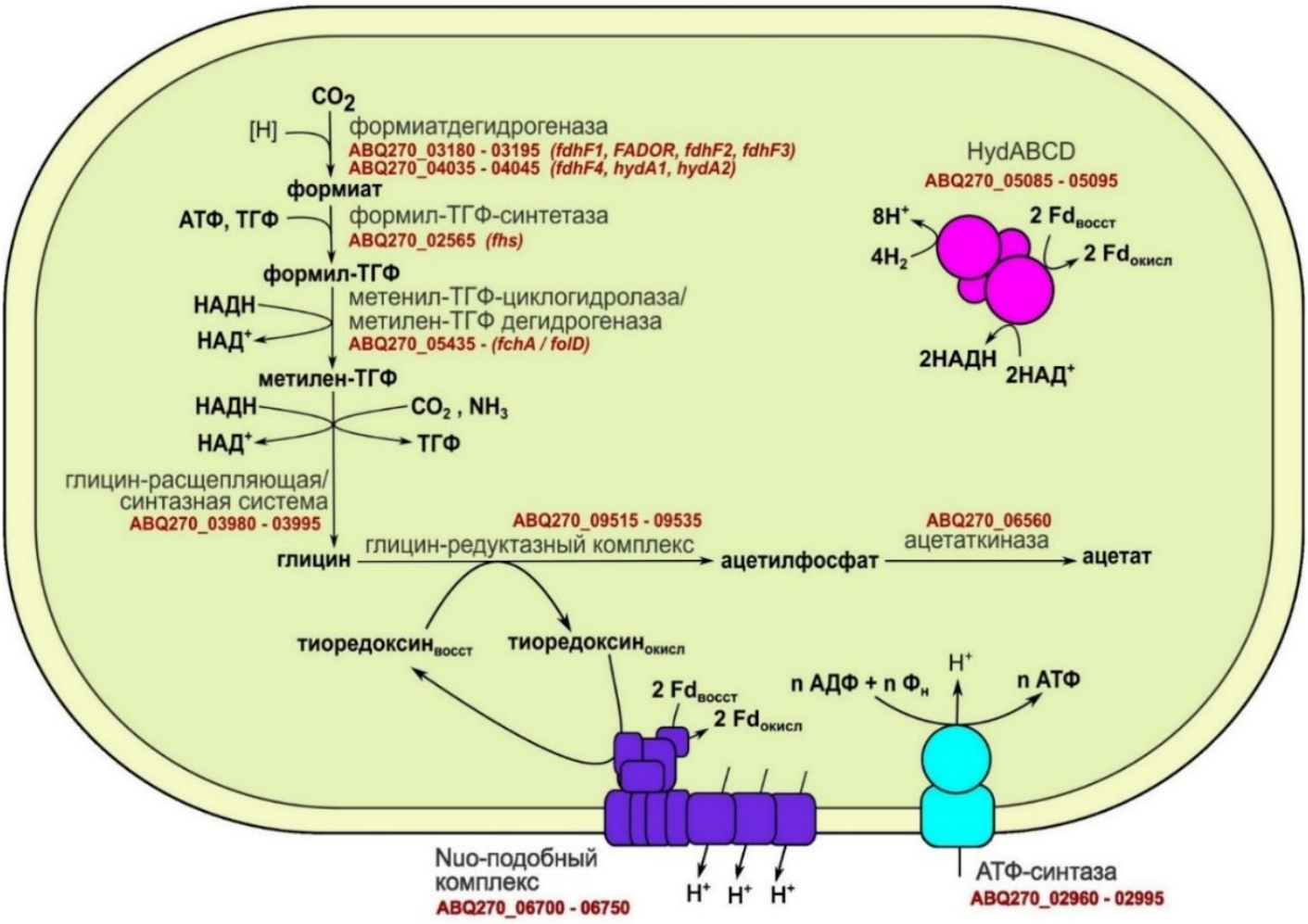


Рисунок 12 – Модель ацетогенеза штамма 3819-GS1 при росте на H_2 и CO_2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование ставило своей целью поиск облигатно автотрофных ацетогенных прокариот, способных получать энергию за счет метаболических реакций, ранее не показанных для ацетогенеза. На первом этапе исследования были описаны и охарактеризованы микробные сообщества горячих источников кальдеры Узон и Байкальской рифтовой зоны, а также подземной биосферы Ессентукского месторождения минеральных вод, что позволило оценить распространение ацетогенных прокариот в термальных местообитаниях Российской Федерации. Полученные результаты также позволили отобрать наиболее перспективные пробы для последующего выделения устойчивых накопительных и чистых культур автотрофных ацетогенных бактерий в присутствии H_2/CO_2. Хемолитоавтотрофные ацетогенные штаммы 3443-3Ac^T, 75b-Ac и 3819-GS1 были получены из образцов горячих источников кальдеры Узон и ЕММВ, в то время как из проб горячих источников БРЗ не удалось получить ни накопительных, ни чистых культур. Вероятно, это связано с тем, что горячие источники Байкала, в отличие от остальных экосистем, представляют собой азотные термы, характеризующиеся высокой концентрацией растворенного свободного азота в воде и ничтожно малыми концентрациями углекислого газа. Горячие источники полуострова Камчатка, в свою очередь, представлены сероводородно-углекислыми и углекислыми термами с высоким содержанием углекислого газа, а для Ессентукских минеральных вод показано крайне высокое значение газового фактора, равное 16,3, причем концентрация CO_2 в газовой фазе исследованной скважины составляла 99,44%. Таким образом, источником выделения автотрофных ацетогенных прокариот оказались углекислые термы, характеризующиеся высокой концентрацией растворенного в воде CO_2.

Последующая работа с новыми изолятами показала, что штаммы 3443-3Ac^T и 75b-Ac являются представителями нового рода и вида *Aceticella autotrophica* gen. nov., sp. nov., в то время как штамм 3819-GS1 представляет новый род и вид *‘Acetitalea autotrophica’* gen. nov., sp. nov. Было установлено, что все три организма являются первыми облигатно автотрофными ацетогенными прокариотами, то есть относятся к группе ацетогенов, существование которой ранее ставилось под сомнение. Факт существования таких прокариот в природных местообитаниях указывает на осуществление ими более энергоэффективных катаболических реакций, ранее не описанных для ацетогенеза. Анализ геномов новых изолятов показал, что ацетогенез у *Ac. autotrophica и ‘At. autotrophica’*, так же как у всех ранее описанных ацетогенных прокариот, представляет собой модульный процесс, состоящий из электронодонорных (окислительный модуль), электроноакцепторных (восстановительный модуль) и энергозапасающих (энергетический модуль) реакций. Однако восстановительный и энергетический модули у новых изолятов были представлены метаболическими реакциями, ранее не описанными для ацетогенеза. Так, на примере *Ac. autotrophica* было показано, что в восстановительном модуле ацетогенеза реакции ПВЛ могут быть частично замещены НАД(Ф)Н-зависимой сероредуктазой, осуществляющей футильный сброс электронов с НАД(Ф)Н на серу. Предположено, что такой механизм «облегченного» ацетогенеза увеличивает энергетический выход окисления водорода, позволяя облигатно автотрофной ацетогенной бактерии выдерживать конкуренцию в

богатых серой вулканических горячих источниках кальдеры Узон. Для *‘At. autotrophica’* была предложена модель «глицинового» ацетогенеза, при которой в восстановительном модуле ацетогенеза функционирует восстановительный глициновый путь, а роль первичного генератора потенциала играет мембранный Nuo-подобный комплекс.

Таким образом, полученные результаты расширяют представления о разнообразии, распространении, экологической роли и метаболизме ацетогенных бактерий и вносят значительный вклад в изучение хемолитоавтотрофного ацетогенеза, что имеет большое значение для дальнейшей разработки технологий ацетогенной ферментации синтез-газа и других С1-содержащих субстратов с целью получения биотехнологически ценных соединений.

ВЫВОДЫ

1. Из образцов горячих источников полуострова Камчатка и Ессентукского месторождения минеральных вод получены хемолитоавтотрофные ацетогенные штаммы 3443-3Ac^{T}, 75b-Ac и 3819-GS1.
2. Охарактеризованы первые облигатно хемолитоавтотрофные ацетогенные бактерии *Aceticella autotrophica* gen. nov., sp. nov. и *‘Acetitalea autotrophica’* gen. nov., sp. nov.
3. В ходе анализа геномов выделенных штаммов обнаружены генетические детерминанты основных метаболических процессов, соответствующие фенотипическим данным. Показано, что ацетогенез у *Ac. autotrophica* и *‘At. autotrophica’*, так же как у всех ранее описанных ацетогенных прокариот, представляет собой модульный процесс, состоящий из электронодонорных (окислительный модуль), электроноакцепторных (восстановительный модуль) и энергозапасающих (энергетический модуль) реакций.
4. На основании выявленных фенотипических признаков и геномного анализа *Ac. autotrophica* предложена модель «облегченного» ацетогенеза, согласно которой путь Вуда-Льюнгдаля в восстановительном модуле ацетогенеза может быть частично замещен НАД(Ф)Н-зависимой сероредуктазой, осуществляющей футильный сброс электронов с НАД(Ф)Н на серу.
5. На основании выявленных фенотипических признаков и геномного анализа *‘At. autotrophica’* предложена модель «глицинового» ацетогенеза, при котором в восстановительном модуле вместо пути Вуда-Льюнгдаля функционирует восстановительный глициновый путь, а энергетический модуль ацетогенеза представлен мембранным Nuo-подобным комплексом.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах перечня ВАК и международных реферативных баз:

1. Frolov E.N., Elcheninov A.G., **Gololobova A.V.**, Toshchakov S.V., Novikov A.A., Lebedinsky A.V., Kublanov I.V. Obligate autotrophy at the thermodynamic limit of life

in a new acetogenic bacterium // Frontiers in Microbiology. – 2023. – V. 14. – 1185739. doi: 10.3389/fmicb.2023.1185739.

2. Maltseva A.I., Elcheninov A.G., Klyukina A.A., **Gololobova A.V**., Lavrentyeva E.V., Banzaraktsaeva T.G., Dambaev V.B., Barkhutova D.D., Zavarzina D.G., Frolov E.N. Microbial Diversity of the Baikal Rift Zone Freshwater Alkaline Hot Springs and the Ecology of Polyextremophilic Dissimilatory Iron-Reducing Bacteria // Biology (Basel). – 2025. – V. 14. – № 12. – 1716. doi: 10.3390/biology14121716.
3. **Gololobova A.V.**, Klyukina A.A., Elcheninov A.G., Frolov E.N. Thermophilic acetogenic bacteria from hot springs of the Uzon Caldera // Microbiology. – 2026. – V. 95. – № 5. – P. 977–982. doi: 10.1134/S0026261726601508.

Тезисы докладов на российских и международных конференциях:

1. **Гололобова А.В.**, Лебединский А.В., Ельченинов А.Г., Кубланов И.В., Фролов Е.Н. Первая облигатно автотрофная ацетогенная бактерия *Aceticella autotrophica* // 3-й Российский микробиологический конгресс, 26 сентября – 01 октября 2021 г., Псков, Сборник тезисов докладов. – 2021. – С. 164.
2. **Гололобова А.В.**, Ельченинов А.Г., Кубланов И.В., Фролов Е.Н. Новая термофильная облигатно автотрофная ацетогенная бактерия *‘Acetitalea autotrophica’* // Актуальные аспекты современной микробиологии: XIII молодежная школа-конференция с международным участием, 16–18 ноября 2022 г., Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Сборник тезисов докладов. – 2022. – С. 50.
3. **Гололобова А.В.**, Лебединский А.В., Ельченинов А.Г., Кубланов И.В., Фролов Е.Н. Первые облигатно автотрофные ацетогенные бактерии // 4-й Российский микробиологический конгресс, 24–29 сентября 2023 г., Томск, Сборник тезисов докладов. – 2023. – С. 187.
4. Фролов Е.Н., **Гололобова А.В.**, Лебединский А.В., Ельченинов А.Г., Кубланов И.В. Новые механизмы запасания энергии у ацетогенных бактерий // 4-й Российский микробиологический конгресс, 24–29 сентября 2023 г., Томск, Сборник тезисов докладов. – 2023. – С. 179–180.
5. Фролов Е.Н., **Гололобова А.В.**, Ельченинов А.Г., Лебединский А.В. Ацетогенные прокариоты с новыми механизмами запасания энергии // 14-ая Международная мультиконференция «Биоинформатика регуляции и структуры геномов / системная биология», 05–10 августа 2024 г., Новосибирск, Тезисы докладов. – 2024. – С. 1419–1421.
6. **Гололобова А.В.**, Заюлина К.С., Клюкина А.А., Лебединский А.В., Ельченинов А.Г., Фролов Е.Н. Скрытый метаболический потенциал ацетогенных прокариот: «облегченный» ацетогенез // 5-й Российский микробиологический конгресс, 29 сентября – 03 октября 2025 года, Волгоградский государственный

медицинский университет, г. Волгоград, Россия, Сборник тезисов докладов. – 2025. – С. 85–86.

7. Фролов Е.Н., **Гололобова А.В.**, Подосокорская О.А., Ельченинов А.Г., Лебединский А.В. Восстановительный глициновый путь как модуль ацетогенеза // 5-й Российский микробиологический конгресс, 29 сентября – 03 октября 2025 года, Волгоградский государственный медицинский университет, г. Волгоград, Россия, Сборник тезисов докладов. – 2025. – С. 98.