

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

ГОЛОЛОВОВА АЛЕКСАНДРА ВАДИМОВНА

**ОБЛИГАТНО АВТОТРОФНЫЕ АЦЕТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ:
ТАКСОНОМИЯ, МЕТАБОЛИЗМ, ЭКОЛОГИЯ**

1.5.11. Микробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Фролов Евгений Николаевич

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
ГЛАВА 1. АЦЕТОГЕННЫЕ ПРОКАРИОТЫ: ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ И РАЗНООБРАЗИЕ.....	15
1.1 История изучения ацетогенных прокариот	15
1.2 Разнообразие ацетогенных прокариот	17
ГЛАВА 2. ЭКОЛОГИЯ АЦЕТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ	20
2.1 Местообитания ацетогенных бактерий.....	20
2.2 Роль ацетогенных бактерий в микробных сообществах	21
2.2.1 Альтернативные доноры электронов, используемые ацетогенными бактериями	22
2.2.2 Альтернативные акцепторы электронов, используемые ацетогенными бактериями	24
2.2.3 Основные конкуренты и партнеры ацетогенных бактерий в микробном сообществе	26
ГЛАВА 3. МЕХАНИЗМ АЦЕТОГЕНЕЗА.....	28
3.1 Окислительный модуль	28
3.1.1 Окисление неорганических соединений	30
3.1.1.1 Окисление водорода.....	30
3.1.1.2 Окисление монооксида углерода	31
3.1.1.3 Окисление фосфита	32
3.1.2 Окисление органических субстратов	33
3.1.2.1 Окисление углеводов	33
3.1.2.2 Окисление лактата.....	34
3.1.2.3 Окисление спиртов.....	35
3.1.2.4 Окисление метилированных и метоксилированных соединений	37
3.2 Восстановительный модуль	37
3.2.1 Метильная ветвь пути Вуда-Льюнгдаля	38
3.2.2 Карбонильная ветвь пути Вуда-Льюнгдаля.....	41

3.3 Энергетический модуль	42
3.3.1 Первичные генераторы	42
3.3.1.1 Rnf-комплекс	42
3.3.1.2 Ech-комплекс	43
3.3.2 АТФ-синтаза	44
3.4 Роль цитохромов и хинонов в метаболизме ацетогенных прокариот	45
ГЛАВА 4. АЦЕТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ В БИОТЕХНОЛОГИИ	48
4.1 Преобразование синтез-газа и его компонентов с использованием ацетогенных бактерий	48
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	53
ГЛАВА 5. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	53
5.1 Объекты исследования	53
5.2 Методы исследования	53
5.2.1 Культивирование ацетогенных бактерий	53
5.2.2 Получение накопительных и чистых культур хемолитоавтотрофных ацетогенных бактерий	57
5.2.3 Изучение морфологии и тонкого строения клеток	57
5.2.4 Определение удельной скорости роста	58
5.2.5 Методы аналитической химии	58
5.2.6 Статистическая обработка данных	60
5.2.7 Выделение ДНК	60
5.2.7.1 Выделение ДНК из природных образцов и накопительных культур	60
5.2.7.2 Выделение геномной ДНК из чистых культур	61
5.2.7.3 Определение концентрации ДНК	62
5.2.8 Таксономическое профилирование микробных сообществ	62
5.2.8.1 Подготовка библиотек гена 16S рРНК для высокопроизводительного секвенирования	62
5.2.8.2 Высокопроизводительное секвенирование на платформе Illumina	63
5.2.8.3 Анализ филогенетического разнообразия прокариот	63
5.2.9 Определение полных последовательностей геномов чистых культур	63

5.2.10 Аннотация геномов	64
5.2.11 Филогенетический анализ	65
5.2.12 Анализ потерь и приобретения генов.....	65
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	67
ГЛАВА 6. НАКОПИТЕЛЬНЫЕ КУЛЬТУРЫ ХЕМОЛИТОАВТОТРОФНЫХ АЦЕТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ.....	67
6.1 Ацетогенные бактерии горячих источников кальдеры Узон (Камчатка)	67
6.2 Ацетогенные бактерии подземной биосферы Ессентукского месторождения минеральных вод	75
6.3 Ацетогенные бактерии горячих источников Байкальской рифтовой зоны	77
ГЛАВА 7. ОПИСАНИЕ НОВОЙ АЦЕТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ <i>ACETICELLA</i> <i>AUTOTROPHICA</i> GEN. NOV., SP. NOV.	81
7.1 Штамм 3443-3Ac ^T	81
7.1.1 Морфология штамма 3443-3Ac ^T	81
7.1.2 Характеристики роста штамма 3443-3Ac ^T	81
7.1.3 Метаболизм штамма 3443-3Ac ^T	83
7.1.3.1 Доноры электронов, используемые штаммом 3443-3Ac ^T	83
7.1.3.2 Акцепторы электронов, используемые штаммом 3443-3Ac ^T	86
7.1.4 Отношение штамма 3443-3Ac ^T к антибиотикам	86
7.1.5 Рост штамма 3443-3Ac ^T на твердых средах.....	87
7.1.6 Хемотаксономическая характеристика штамма 3443-3Ac ^T	87
7.1.7 Филогенетическая характеристика штамма 3443-3Ac ^T	87
7.1.8 Анализ генома штамма 3443-3Ac ^T	93
7.1.8.1 Генетические детерминанты ацетогенеза при росте на H ₂ /CO ₂	93
7.1.8.2 Генетические детерминанты ацетогенеза у штамма 3443-3Ac ^T при росте на формиате.....	96
7.1.8.3 Генетические детерминанты ацетогенеза у штамма 3443-3Ac ^T при росте на СО	98
7.1.8.4 Причины неспособности роста штамма 3443-3Ac ^T к гетеротрофному росту.....	99

7.1.8.5 Генетические детерминанты метаболизма серы у штамма 3443-3Ac ^T	102
7.2 Штамм 75b-Ac	103
ГЛАВА 8. ОПИСАНИЕ НОВОЙ АЦЕТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ ' <i>ACETITALEA</i> <i>AUTOTROPHICA</i> ' GEN. NOV., SP. NOV.....	106
8.1 Морфология штамма 3819-GS1	106
8.2 Характеристики роста штамма 3819-GS1	107
8.3 Метаболизм штамма 3819-GS1	108
8.3.1 Доноры электронов, используемые штаммом 3819-GS1	108
8.3.2 Акцепторы электронов, используемые штаммом 3819-GS1	109
8.4 Отношение штамма 3819-GS1 к антибиотикам	109
8.5 Рост штамма 3819-GS1 на твердых средах.....	109
8.6 Филогенетическая характеристика штамма 3819-GS1.....	112
8.7 Анализ генома штамма 3819-GS1.....	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	118
ВЫВОДЫ	120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	121

ВВЕДЕНИЕ

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 геной 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 запасаения 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 запасаения 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-Льюнгаля (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 аминоксилот, 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-Льюнгаля.
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.

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.

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.

Объем и структура диссертации

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 иностранном языках.

Место проведения работы и благодарности

Работа была выполнена в лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН в 2022–2026 гг.

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. Тоцакову, 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.

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 запасаания 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 запасаания энергии // 14-ая Международная мультikonференция «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.

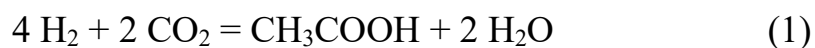
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА 1. АЦЕТОГЕННЫЕ ПРОКАРИОТЫ: ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ И РАЗНООБРАЗИЕ

Ацетогенные прокариоты – это полифилетическая физиологическая группа микроорганизмов, осуществляющих восстановление двух молекул углекислого газа до одной молекулы ацетата. Особенностью ацетогенных прокариот является высокая пластичность их метаболизма, которая заключается в способности преобразовывать в ацетат широкий спектр органических и неорганических соединений, преимущественно образующихся разнообразными микроорганизмами при гидролизе и сбраживании органического вещества на начальных этапах деструкции мортмассы. Наибольший интерес вызывает способность этой группы к хемолитоавтотрофному росту в присутствии H_2/CO_2 , CO и синтез-газа. Вместе с тем на момент начала данного исследования в литературе отсутствовали примеры облигатно автотрофных ацетогенов. Помимо разнообразных доноров электронов и источников углерода, ацетогенные прокариоты способны использовать широкий спектр альтернативных, отличных от CO_2 , акцепторов электронов, что позволяет им адаптироваться к различным, в том числе и экстремальным, условиям обитания. Пластичность метаболизма ацетогенов обуславливает важную роль, которую выполняют эти микроорганизмы во взаимосвязи глобальных циклов элементов.

1.1 История изучения ацетогенных прокариот

Изучение ацетогенных прокариот началось в начале XX века с работ исследовательской группы Ф. Фишера, которая обнаружила H_2 -зависимое восстановление CO_2 до ацетата микробным сообществом сточных вод (Fischer et al., 1932). Вскоре из почвенных образцов была выделена первая чистая культура факультативно автотрофной ацетогенной бактерии, получившей название *Clostridium aceticum* (Wieringa, 1936). Данный микроорганизм, как было установлено, использовал H_2 в качестве донора электронов и CO_2 в качестве акцептора в соответствии со стехиометрией:



К сожалению, культура *C. aceticum* была впоследствии утрачена, и повторное выделение этого микроорганизма состоялось лишь во второй половине XX века (Adamse, 1980). Детальная же расшифровка механизма ацетогенеза проводилась на термофильной бактерии *Clostridium thermoaceticum*, выделенной из конского навоза (Fontaine et al., 1942), которая в дальнейшем была реклассифицирована как *Moorella thermoacetica* (Collins et al., 1994), а с 2025 года род *Moorella* переименован в *Neomoorella* (Gtari and Ventura, 2025). Именно у *N. thermoacetica* впервые обнаружили необычный процесс окисления глюкозы, при котором единственным конечным продуктом выступал ацетат (уравнение 2), ввиду чего этот процесс получил название «гомоацетатное брожение».



На первый взгляд между реакциями (1) и (2) не прослеживалось прямой связи, однако многолетние исследования, проведенные Х.Г. Вудом и Л. Льюнгдалем, показали, что при окислении глюкозы согласно уравнению (2) две молекулы ацетата образуются в ходе классического гликолиза, тогда как третья синтезируется в ходе восстановления CO_2 водородом. Это открытие легло в основу описания восстановительного ацетил-КоА пути, впоследствии названного путем Вуда-Льюнгдаля (Ljungdahl, 1986; Wood and Ljungdahl, 1991). Таким образом, было установлено, что процессы, описываемые уравнениями (1) и (2), объединены общим биохимическим механизмом.

Полученные данные позволили пересмотреть природу метаболизма *N. thermoacetica*: утилизация глюкозы этим микроорганизмом представляла собой не брожение в традиционном понимании, а особый тип дыхания, получивший название ацетогенеза. Тем не менее вопрос о том, каким образом ПВЛ сопряжен с получением клеткой энергии, долгое время оставался нерешенным. Суммарный баланс АТФ данного пути равен нулю: одна молекула АТФ затрачивается на активацию формата и одна синтезируется в ацетаткиназной реакции. Обнаружение у *N. thermoacetica* цитохрома *b* и менахинонов дало основание предполагать наличие у ацетогенов цитохром-зависимой электрон-транспортной

цепи (ЭТЦ) (Gottwald et al., 1975), однако дальнейшие исследования показали, что многие представители этой физиологической группы лишены как цитохромов, так и хинонов.

К концу XX века благодаря интенсивному изучению энергетического метаболизма ацетогенных бактерий было показано, что запасание энергии у них осуществляется в ходе окислительного фосфорилирования (Ljungdahl, 1994; Müller and Grüber, 2003). Было обнаружено, что ключевую роль в создании трансмембранного электрохимического потенциала играет одна из двух мембранных ферментных систем: Rnf-комплекс, функционирующий как ферредоксин:НАД⁺ оксидоредуктаза (Biegel and Müller, 2010; Körpke et al., 2010; Tremblay et al., 2012), и Ech-комплекс, представляющий собой мембраноассоциированную гидрогеназу (Schuchmann and Müller, 2014; Basen and Müller, 2017; Schoelmerich and Müller, 2019). Обобщение накопленных данных послужило основой для классификации ацетогенных бактерий, разделившей их на две метаболические группы в зависимости от типа энергетического комплекса: Rnf- и Ech-содержащие ацетогены (Schuchmann and Müller, 2014). Поскольку каждый из этих комплексов может использовать в качестве энергосопрягающего иона как H⁺, так и Na⁺, внутри каждой группы были дополнительно выделены две подгруппы: H⁺-зависимые и Na⁺-зависимые формы. Типичным представителем Rnf-содержащих H⁺-зависимых ацетогенов выступает *C. ljungdahlii*, тогда как к Rnf-содержащим Na⁺-зависимым организмам относится *A. woodii*. Среди Ech-содержащих ацетогенов к H⁺-зависимым принадлежат термофильные виды *N. thermoacetica*, *Thermoanaerobacter kivui* и *Thermacetogenium phaeum*. Представителей Ech-содержащих Na⁺-зависимых ацетогенных бактерий на сегодняшний день не обнаружено (Schuchmann and Müller, 2014).

1.2 Разнообразие ацетогенных прокариот

На данный момент выделено и охарактеризовано более 100 видов ацетогенных бактерий, относящихся к 25 семействам (Poehlein et al., 2025). Анализ таксономической принадлежности ацетогенных микроорганизмов показывает

неравномерное распределение представителей данной физиологической группы на древе жизни. Подавляющее большинство охарактеризованных ацетогенных прокариот принадлежит к филуму *Bacillota*, однако также известны ацетогенные бактерии, относящиеся к филумам *Spirochaetota* (*Treponema azotonutricum*, *Treponema primitia*), *Desulfobacterota* (*Desulfotignum phosphitoxidans*) и *Acidobacteriota* (*Holophaga foetida*) (Ragsdale and Pierce, 2008). Интересно, что одни таксоны могут включать в себя только ацетогенных представителей (например роды *Acetobacterium* и *Sporomusa*), тогда как другие таксоны объединяют как ацетогенных, так и не способных к ацетогенезу прокариот (роды *Clostridium* и *Thermoanaerobacter*). Исследования, основанные на метагеномных данных, также предполагают наличие способности к ацетогенезу у ряда представителей глубоких филогенетических линий, например '*Acetocimmeria pyornia*' из филума *Bacillota* и различных представителей филума '*Bipolaricaulota*' (ранее '*Acetothermia*') (Colman et al., 2022).

Вопрос о существовании ацетогенеза у представителей домена Archaea до настоящего времени остается дискуссионным. В присутствии СО образование ацетата, наряду с другими продуктами метаболизма, было зафиксировано у *Methanosarcina acetivorans* и *Archaeoglobus fuldigus* из филума *Methanobacteriota* (Rother and Metcalf, 2004; Henstra et al., 2007), однако подробности этого процесса до недавнего времени оставались неизвестными. В ходе изучения метаболизма *M. acetivorans* было установлено, что при росте этого микроорганизма на СО представленность метилтрансферазы в протеоме снижается примерно в восемь раз по сравнению с ростом на метаноле (Lessner et al., 2006). Мутантный штамм с делецией генов, кодирующих метилтрансферазу, после определенного периода адаптации демонстрировал устойчивый ацетогенный рост на СО, следовательно, энергетический метаболизм генномодифицированного штамма не зависел от ферментов пути метаногенеза. И хотя в данном случае говорить о полной перестройке метаболизма мутанта с метаногенеза на ацетогенез нельзя, так как наряду с ацетатом синтезировались следовые количества метана, а промежуточные продукты метаногенеза были важны для биосинтетических процессов клетки, все

же эти результаты позволяют предположить, что метаболизм *M. acetivorans* отражает переходное состояние в эволюции от ацетогенного микроорганизма к метаногенному (Schöne et al., 2022).

Анализ метагеномных данных позволил предположить также наличие способности к ацетогенезу у представителей филумов *Bathyarchaeota* и *Lokiarchaeota* (Evans et al., 2015; He et al., 2016; Suzuki et al., 2018; Orsi et al., 2020), а также у группы ANME-2a, осуществляющей анаэробное окисление метана (Yang et al., 2020). Предполагаемый механизм ацетогенеза у архей отличается от бактериального задействованными в нем коферментами и низкопотенциальными переносчиками электронов, а генерация мембранного потенциала, предположительно, обеспечивается F_{420} :метанофеназин оксидоредуктазным комплексом (Fpo), гомологичным бактериальной Ech-гидрогеназе. Однако наличие у архей способности к ацетогенезу все еще не подтверждено экспериментально, поэтому далее в тексте внимание будет сфокусировано лишь на представителях домена Bacteria.

ГЛАВА 2. ЭКОЛОГИЯ АЦЕТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

2.1 Местообитания ацетогенных бактерий

Ацетогенные микроорганизмы являются облигатными анаэробами, что связано с необходимостью поддержания восстановительных условий для функционирования ключевых ферментов ацетогенеза, а также с высокой чувствительностью к O_2 большинства из этих ферментов (Ragsdale and Pierce, 2008). Такая повышенная чувствительность объясняется тем, что активные центры СО-дегидрогеназы/ацетил-КоА синтазы (СОДГ/АКС), форматдегидрогеназы и разнообразных гидрогеназ, функционирующих на разных этапах ацетогенеза, содержат ионы металлов и железосерные кластеры, которые в большинстве своем инактивируются в присутствии O_2 (Whitham et al., 2015). К тому же в аэробных условиях происходит химическое окисление низкопотенциальных ферредоксинов — единственных возможных доноров электронов для осуществления реакции восстановления CO_2 до СО (Misra and Fridovich, 1971). В связи с этим большинство описанных ацетогенных бактерий были получены из образцов типично анаэробных местообитаний, в том числе осадков пресных и соленых вод (Braun et al., 1979; Eichler and Schink, 1984), торфяников (Chaikitkaew et al., 2022), желудочно-кишечных трактов человека (Nagara et al., 2022), травоядных животных (Sharak Genthner et al., 1981; Rieu-Lesme et al., 1998), термитов (Breznak et al., 1988; Kane and Breznak, 1991; Leadbetter et al., 1999), сообществ метантенков (Jiang et al., 2009), компостов (Böer et al., 2024b), навоза (Tanner et al., 1993; Zhu et al., 2018) и осадков сточных вод (Andreesen et al., 1970; Tanner et al., 1993). Также ацетогенные бактерии были обнаружены в экстремальных местах обитания, таких как содовые озера (Zhilina et al., 1996; Zhilina et al., 1998; Pikuta et al., 2003; Sorokin et al., 2021), грязевые вулканы (Khomyakova et al., 2020), горячие источники (Wiegel et al., 1981; Slobodkin et al., 1997; Slobodkina et al., 2022), кислотные угольные бассейны (Küsel et al., 2000; Liou et al., 2005), подземная биосфера (Liu and Suflita, 1993; Krumholz et al., 1999). В то же время некоторые представители ацетогенов способны переживать короткие периоды экспозиции с небольшими количествами кислорода

благодаря наличию у них антиоксидантных систем, в том числе пероксидаз, каталаз, супероксиддисмутаз, НАДН-оксидаз, рубредоксиноксидоредуктаз, рубреритринов и цитохром-*bd*-оксидаз (Küsel et al., 2001; Karnholz et al., 2002; Silaghi-Dumitrescu et al., 2003; Das et al., 2005; Kawasaki et al., 2009). Это позволило представителям данной физиологической группы получить широкое распространение в местах обитания с неустойчивыми окислительно-восстановительными условиями: чистые культуры ацетогенных микроорганизмов были получены из образцов аэрируемых почв тундры (Simankova et al., 2000), умеренных лесов (Kuhner et al., 1997), степей и пустынь (Göbner and Drake, 1997; Goessner et al., 1998; Göbner et al., 1999) и зон укоренения макрофитов в эстуариях и соленых маршах (Küsel et al., 2001; Göbner et al., 2006).

2.2 Роль ацетогенных бактерий в микробных сообществах

В структуре анаэробных микробных сообществ, ответственных за разложение органического вещества, ацетогенные бактерии выполняют функцию связующего звена между микроорганизмами-бродильщиками и ацетокластическими метаногенами (McInerney and Bryant, 1981; Drake et al., 2008). На первом этапе функционирования такого сообщества происходит гидролиз сложных органических полимеров и последующее сбраживание образовавшихся мономерных и олигомерных продуктов, в результате чего синтезируется широкий спектр органических кислот и спиртов, а также H_2 и CO_2 , являющиеся продуктами брожения. Однако метаногенные археи на терминальной стадии деструкции органического вещества могут использовать только часть перечисленных продуктов, а именно ацетат, H_2 и одноуглеродные соединения. Поэтому разнообразные продукты брожения, образовавшиеся на начальной стадии деструкции органического вещества, используются ацетогенными бактериями и микроорганизмами, осуществляющими синтрофное окисление спиртов и жирных кислот. В результате все разнообразие продуктов брожения сводится к ацетату, H_2 , CO_2 и формиату, которые служат субстратом для метаногенов (Venkiteshwaran et al., 2016). При наличии в среде внешних акцепторов электронов, например

сульфата или нитрата, метаногены могут быть замещены группами микроорганизмов, осуществляющих восстановление этих анионов (Scheid et al., 2003).

2.2.1 Альтернативные доноры электронов, используемые ацетогенными бактериями

Помимо низкомолекулярных продуктов брожения, ацетогенные бактерии способны утилизировать и более сложные субстраты, в том числе сахара, аминокислоты, пептиды, а также метоксилированные ароматические соединения. Хотя большинство известных ацетогенов не обладают способностью к гидролизу высокомолекулярных полимеров (полисахаридов, белков, липидов), встречаются и исключения: для *Bryantella formatexigens* показана активность в отношении аморфной целлюлозы (Wolin et al., 2003), а для *N. thermoacetica* F21 – в отношении кристаллической (Karita et al., 2003).

Для некоторых ацетогенов показана способность использовать в качестве доноров электронов фосфит (HPO_3^{2-}). Впервые диссимиляционное окисление фосфита было обнаружено у выделенной из пробы морских осадков ацетогенной бактерии *D. phosphitoxidans* (Schink and Friedrich, 2000; Schink et al., 2002), которая остается ключевым объектом для изучения этого метаболического процесса (Poehlein et al., 2013; Simeonova et al., 2010; Mao et al., 2023). HPO_3^{2-} активно образуется в системах с восстановительными условиями в ходе химических (коррозия металлических фосфидов, восстановление фосфата под действием Fe^0) и биологических (биологическое разложение фосфонатов) превращений, а также накапливается в среде в результате антропогенной деятельности, что делает его широко распространенным донором электронов (Ewens et al., 2021).

Большое значение для экологии ацетогенных бактерий имеет их способность к автотрофному росту с использованием монооксида углерода, который выступает одновременно в роли донора электронов и источника углерода. Согласно литературным данным, фоновое содержание CO в атмосфере колеблется в пределах 0,05–0,3 ppm (Novelli et al., 1994). Основной вклад в глобальную эмиссию CO

($1200\text{--}2850 \times 10^9$ кг/год) вносят антропогенные процессы сжигания ископаемого топлива и биомассы, а также фотохимическое окисление метана и других углеводородов в атмосфере, в то время как природные источники, такие как океаны и растительность, обеспечивают существенно меньший приток ($80\text{--}360 \times 10^9$ кг/год), составляющий лишь 10–15% от суммарного поступления СО в атмосферу (Rich and King, 1998). Ацетогенные бактерии демонстрируют существенные различия в способности к утилизации данного субстрата. Среди них выделяют виды, способные к активному росту на СО без необходимости в дополнительных источниках энергии, например к таким видам относятся *N. thermoacetica* и *C. ljungdahlii*. Другие ацетогены, как например *T. kivui*, проявляют способность к росту на СО лишь после продолжительной адаптации (Weghoff and Müller, 2016; Носq et al., 2025). Третья группа, представителем которой является *A. woodii*, утилизирует СО исключительно в присутствии дополнительных субстратов, таких как формиат или смесь H_2/CO_2 (Bertsch and Müller, 2015b). Ограниченная способность двух последних групп к автотрофному росту на СО объясняется особенностями их ферментных систем: в ПВЛ у этих бактерий функционирует H_2 -зависимая CO_2 -редуктаза (HDCR) – комплекс, содержащий гидрогеназу с повышенной чувствительностью к ингибирующему действию СО (Baffert et al., 2011; Bertsch and Müller, 2015b). СО является высокоэнергетическим донором электронов (E^0 [CO_2/CO] = -520 мВ), благодаря чему метаболические способности СО-толерантных ацетогенов расширяются. Например, для '*C. autoethanogenum*' показано, что в условиях высокой концентрации СО клетка продуцирует не ацетат, а этанол. Это связано с переходом на так называемый метаболизм переполнения, при котором избыток восстановительных эквивалентов, образующихся при окислении СО, расходуется на восстановление ацетата до этанола, а вместе с этим обеспечивается снижение токсического действия СО и повышение скорости роста культуры (Allaart et al., 2023). Эта особенность активно используется в промышленности, где '*C. autoethanogenum*' является ключевым продуцентом этанола из синтез-газа.

Важную роль играет способность некоторых ацетогенов использовать в качестве доноров электронов твердофазные соединения, например катоды. Так, для чистых культур нескольких представителей родов *Sporomusa*, *Clostridium* и *Neomoorella* показана различная степень интенсивности электросинтеза (Nevin et al., 2010; Nevin et al., 2011; Böer et al., 2024a). Накопление значительного количества галофильных ацетогенных бактерий вместе с ацетат-окисляющими бактериями рода *Marinobacter* было показано при помощи анализа метагеномов микробных сообществ, сформировавшихся на катоде в электросинтетической установке с инокулятом в виде пробы подводного соляного озера в Красном море (Alqahtani et al., 2019). К другому типу твердофазных доноров, используемых ацетогенами, относится металлическое железо (Fe^0). Было показано, что, наряду с сульфатредуцирующими бактериями и метаногенными археями, некоторые ацетогены способны индуцировать коррозию металлов в пресноводных и морских экосистемах в ходе прямого окисления Fe^0 до Fe^{2+} . Такой процесс был доказан для чистых культур представителей рода *Sporomusa* (Kato et al., 2015), а в микробных сообществах образцов, отобранных из газопроводов и объектов инфраструктуры хранения газа в местах с визуальными следами коррозии, было детектировано значительное количество представителей рода *Acetobacterium* (Way et al., 2026).

2.2.2 Альтернативные акцепторы электронов, используемые ацетогенными бактериями

Гибкость метаболизма ацетогенных бактерий проявляется не только в способности использовать широкий спектр доноров электронов и источников углерода, но и в свойственной большинству представителей этой группы способности переключаться в подходящих условиях с ацетогенеза на использование иных типов дыхания. В роли альтернативных акцепторов электронов могут выступать нитрат, сульфат, тиосульфат, перхлорат, Fe^{3+} , фумарат и другие окисленные соединения (Drake et al., 2008). Восстановление этих веществ зачастую обеспечивает клетки большим количеством энергии, чем восстановление CO_2 , поэтому многие ацетогены относятся к категории «факультативных», то есть

они прибегают к ацетогенезу лишь при отсутствии во внешней среде более выгодных акцепторов (Drake et al., 2008).

Возможность утилизировать широкий круг соединений позволяет этим бактериям успешно осваивать экологические ниши с различными окислительно-восстановительными условиями. Так, *N. thermoacetica* отдает предпочтение NO_3^- как конечному акцептору электронов (Frösth et al., 1996), причем присутствие в среде NO_3^- приводит к ингибированию активности ферментов ПВЛ (Arendsen et al., 1999). Это позволяет бактерии существовать не только в строго восстановительных условиях, но и в более окисленной среде, а также объясняет присутствие данного микроорганизма в сообществах аэрируемых почв, где окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) высоко изменчив (Goessner et al., 1998; Gößner et al., 1999). Способность восстанавливать NO_3^- также показана для некоторых представителей родов *Sporomusa*, *Clostridium* и др. (Emerson et al., 2019; Visser et al., 2016; Waschinger et al., 2026).

Для *N. thermoacetica* также показано параллельное восстановление диметилсульфоксида и CO_2 , которое приводит к увеличению удельной скорости роста в 3 раза, однако биохимические подробности процесса пока не известны (Rosenbaum et al., 2022). Увеличение биомассы и скорости роста наблюдается и у *A. woodii* при восстановлении двойных связей в производных фенилакрилатов, сопряженном с окислением метанола. Так, при добавлении кофеата к CO_2 в качестве дополнительного акцептора электронов детектируется синтез меньших количеств ацетата и образование гидрокофеата (Bache and Pfennig, 1981). В присутствии метанола и других доноров электронов, содержащих метильную группу ($-\text{CH}_3$), также наблюдается диссимиляционное восстановление фумарата до сукцината у *Clostridium formicoaceticum* и *C. aceticum* (Matthies et al., 1993). К другим альтернативным акцепторам электронов, используемым ацетогенами, относятся тиосульфат, сульфат (Beaty and Ljungdahl, 1990; Hattori et al., 2000), перхлорат (Balk et al., 2008, 2010).

2.2.3 Основные конкуренты и партнеры ацетогенных бактерий в микробном сообществе

В отсутствии акцепторов электронов, отличных от CO_2 , главными потребителями H_2 в микробном сообществе являются ацетогенные бактерии и гидрогенотрофные метаногены, в результате чего возникает конкуренция этих физиологических групп за H_2 (Ragsdale and Pierce, 2008). В морских местообитаниях, для которых характерно высокое содержание сульфатов, метаногены зачастую замещены сульфатредуцирующими прокариотами, также вступающими в конкуренцию за H_2 . Ацетогены значительно уступают в этой борьбе обозначенным физиологическим группам, так как получают намного меньше энергии при гидрогенотрофном росте, а также имеют гораздо более низкое сродство к H_2 . Изменение свободной энергии Гиббса в стандартных условиях (давление 1 атм, температура 25 °С, концентрации вступающих в реакцию веществ 1 М) при H_2 -зависимой сульфатредукции достигает -152 кДж/моль, при гидрогенотрофном метаногенезе -136 кДж/моль, а при литоавтотрофном ацетогенезе этот показатель составляет лишь -105 кДж/моль (Thauer et al., 1977). Концентрации H_2 , минимально необходимые для протекания сульфатредукции, гидрогенотрофного метаногенеза и автотрофного ацетогенеза и рассчитанные для стандартных условий, составляют 0,6, 11 и 410 нМ соответственно (Lever, 2011). Однако в природных местообитаниях условия сильно отличаются от стандартных, в особенности за счет невозможности накопления значительных концентраций H_2 , необходимых для протекания ацетогенеза, так как H_2 легко улетучивается из системы или же быстро рассеивается в ходе межвидового транспорта H_2 (Piché-Choquette and Constant, 2019). Поэтому с учетом условий, близких к природным (парциальное давление H_2 и CH_4 10^{-4} и 0,5 атм соответственно; концентрации HCO_3^- и ацетата 100 и 10 мМ соответственно), рассчитанное значение изменения свободной энергии Гиббса для реакции гидрогенотрофного метаногенеза составляет -40 кДж/моль, а для реакции литоавтотрофного ацетогенеза – всего лишь -13 кДж/моль, что меньше значения, принятого за минимальный биологический квант энергии (Schink, 1997; Laura and Jo, 2023). Совокупность этих

факторов, по-видимому, объясняет, почему к настоящему времени описаны исключительно факультативно хемолитоавтотрофные ацетогенные прокариоты, хотя теоретически нельзя исключать существование и облигатно хемолитоавтотрофных ацетогенов.

Для некоторых мест обитания с пониженными температурами ($< +15\text{ }^{\circ}\text{C}$) было установлено, что гидрогенотрофный ацетогенез начинает преобладать над гидрогенотрофным метаногенезом, а основная масса CH_4 в этих условиях синтезируется в результате использования ацетата ацетокластическими метаногенами (Conrad and Wetter, 1990). Такое перенаправление потоков углерода наблюдалось, в частности, в сообществах рисовых полей (Chin and Conrad, 1995; Fu et al., 2019), озерных осадков (Schulz and Conrad, 1996; Nozhevnikova et al., 1997; Glissman et al., 2004) и почв (Küsel and Drake, 1995; Fu et al., 2015). Это может быть связано с отсутствием известных на данный момент и идентифицируемых психрофильных гидрогенотрофных метаногенов, а также со способностью ацетогенных бактерий расти миксотрофно с использованием дополнительных органических доноров электронов в паре с H_2 (Peters et al., 1998; Conrad, 2023).

Некоторые ацетогенные бактерии способны не только синтезировать ацетат, но и окислять его до H_2 и CO_2 в реакциях, обратных реакциям ПВЛ, находясь в синтрофной ассоциации с гидрогенотрофными метаногенами или сульфатредукторами. Данный процесс происходит в условиях дефицита энергии, однако немедленное удаление гидрогенотрофными метаногенами полученного от ацетогенов H_2 делает такое превращение ацетата в метан термодинамически возможным. К числу ацетогенных бактерий, участвующих в этом процессе, относятся *Clostridium ultunense* (Schnürer et al., 1996), *Ta. phaeum* (Hattori et al., 2000) и штамм AOR, выделенный совместно с *Methanobacterium sp.* THF (Zinder and Koch, 1984; Lee and Zinder, 1988).

ГЛАВА 3. МЕХАНИЗМ АЦЕТОГЕНЕЗА

Ацетогенез – это анаэробное дыхание, в ходе которого происходит восстановление CO_2 , играющего роль акцептора электронов, до ацетил-КоА, а затем до ацетата или иных двух- или четырехуглеродных соединений. Принято выделять три модуля ацетогенеза (Рисунок 1). Окислительный модуль представлен электронодонорными реакциями, набор которых зависит от окисляемого субстрата. Восстановительный модуль у всех известных до данной работы ацетогенов представлен восстановительным ацетил-КоА путем (ПВЛ), осуществляющим функцию переноса электронов от восстановительных эквивалентов на CO_2 . Энергетический модуль обеспечивает запасание энергии мембраносвязанной системой, состоящей из первичного генератора трансмембранного потенциала и АТФ-синтазы (Schuchmann and Müller, 2014; Schuchmann and Müller, 2016).

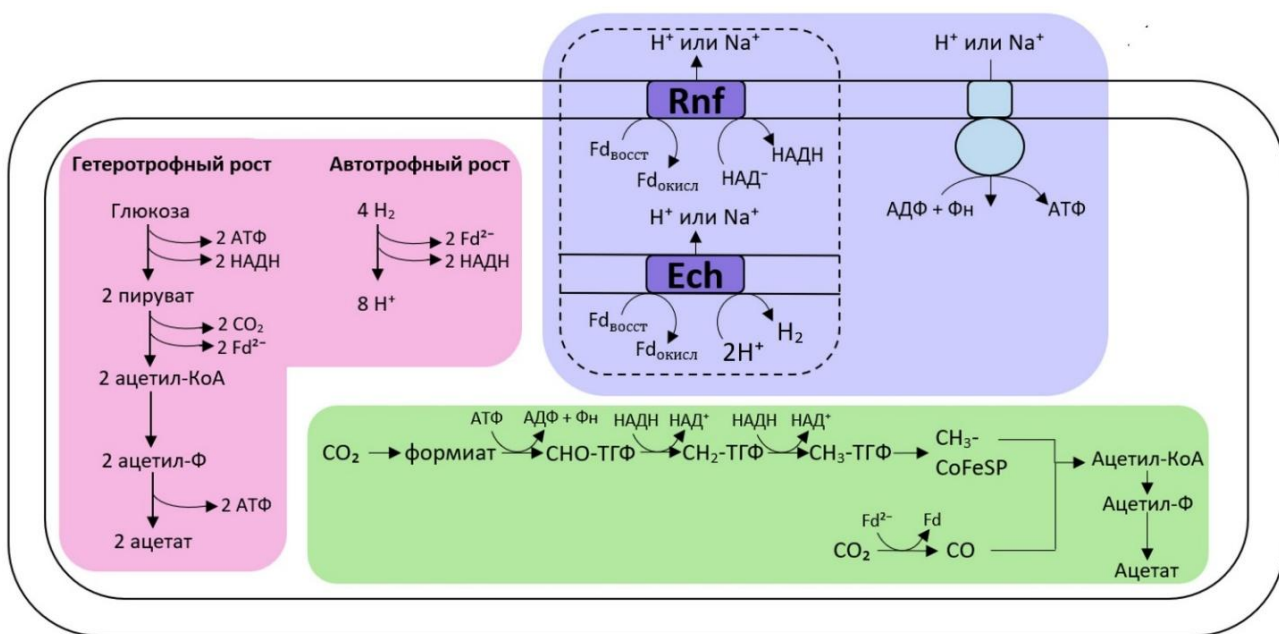


Рисунок 1 – Общая схема, отражающая модульность процесса ацетогенеза. Окислительный модуль обозначен розовым, восстановительный – зеленым, энергетический – сиреневым.

3.1 Окислительный модуль

Первый этап ацетогенеза включает в себя окисление разнообразных органических и неорганических субстратов, в результате чего электроны всегда переносятся на два типа восстановительных эквивалента: НАД(Ф)⁺ и низкопотенциальный ферредоксин (Fd_{окисл}). Следует подчеркнуть, что ключевой

термодинамической преградой ацетогенеза является катализируемое СО-дегидрогеназой (СОДГ) восстановление CO_2 до СО, так как ОВП данной пары является чрезвычайно низким и равен -520 мВ (Thauer et al., 1977). Для преодоления этого термодинамического барьера требуются низкопотенциальные ферредоксины, чей стандартный ОВП может достигать значений от -450 до -500 мВ, а при физиологических условиях – ниже -500 мВ (Bar-Even, 2013). Прямое восстановление этих низкопотенциальных ферредоксинов может быть осуществлено лишь узким кругом ферментов, например вольфрамсодержащей альдегид:ферредоксин оксидоредуктазой (Heider et al., 1995) или пируват:ферредоксин оксидоредуктазой (Blamey and Adams, 1993), функционирующих в реакциях гликолиза при хемоорганогетеротрофном росте (Kuhns et al., 2020). Как было уже отмечено, ацетогенные бактерии отличаются значительной метаболической пластичностью, которая позволяет им утилизировать множество органических и неорганических субстратов, следовательно, окислительный модуль может включать широкий спектр иных реакций, протекающих без участия двух упомянутых выше ферментов. Способность к утилизации широкого спектра органических и неорганических субстратов, сопряженная с генерацией низкопотенциальных $\text{Fd}_{\text{восст}}$, зачастую обеспечивается у ацетогенных бактерий механизмом флавин-зависимой бифуркации электронов (Schuchmann and Müller, 2014).

Бифуркация электронов – это процесс, в ходе которого происходит преодоление энергетического барьера термодинамически невозможной эндотермической реакции при помощи ее сопряжения с экзотермическим процессом (Buckel and Thauer, 2018). Описано два механизма бифуркации электронов: хинон-зависимая, характерная для реакций, в ходе которых происходит генерация мембранного потенциала, и флавин-зависимая, используемая для генерации низкопотенциальных восстановителей в клетке без дополнительной затраты энергии (Peters et al., 2016). Многие строго анаэробные прокариоты, в том числе и ацетогенные бактерии, используют при окислении субстратов механизм флавин-зависимой бифуркации электронов. Например, в

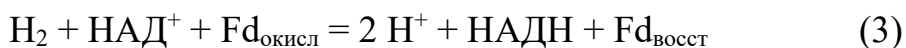
окислительном модуле ацетогенеза с использованием H_2 в качестве донора электронов ($E^{0'} [H^+/H_2] = -414$ мВ) эндотермическое восстановление низкопотенциального $Fd_{\text{окисл}}$ ($E^{0'} [Fd_{\text{окисл}}/Fd_{\text{восст}}] = -500$ мВ) термодинамически сопряжено с экзотермическим восстановлением НАД⁺ ($E^{0'} \text{НАД}^+/\text{НАДН} = -320$ мВ) (Müller et al., 2018), а работа электронбифуркационного комплекса преобразует суммарную реакцию в экзотермическую, обеспечивая образование $Fd_{\text{восст}}$ и НАДН в соотношении 1:1 (Schuchmann and Müller, 2012; Buckel and Thauer, 2013; Imran et al., 2024).

3.1.1 Окисление неорганических соединений

Одним из уникальных свойств ацетогенов является их способность к синтезу ацетата с использованием в качестве доноров электронов H_2 , CO или HPO_3^{2-} , а в качестве акцептора электронов CO_2 , то есть, в ходе литоавтотрофного ацетогенеза.

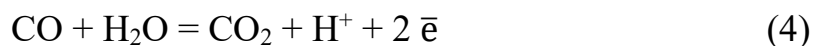
3.1.1.1 Окисление водорода

В случае использования H_2 в качестве единственного донора электронов его окисление происходит в ходе реакции, катализируемой электрон-бифуркационной гидрогеназой. Этот ферментативный комплекс обеспечивает бифуркацию электронов для преодоления термодинамического барьера, возникающего из-за неспособности НАДН напрямую восстановить протоны ($E^{0'} [H^+/H_2] = -414$ мВ). Это гетеромультимерные [FeFe]-гидрогеназы, для функционирования которых необходимо наличие трех основных субъединиц: HydA, содержащей H-кластер (активный сайт [FeFe]-гидрогеназ, катализирующий окисление H_2), один [2Fe-2S]-кластер и три [4Fe-4S]-кластера; HydB, содержащей флавинмонопнуклеотид (ФМН), один [2Fe-2S]-кластер и три [4Fe-4S]-кластера; HydC, содержащей один [2Fe-2S]-кластер (Schuchmann et al., 2018; Katsyov et al., 2023). Результатом работы бифуркационной гидрогеназы является образование НАДН и $Fd_{\text{восст}}$ в эквимольных количествах согласно уравнению (3):



3.1.1.2 Окисление монооксида углерода

Как было отмечено ранее, СО является одним из наиболее энергетически богатых субстратов ($E^{0'}$ [CO₂/CO] = –520 мВ), поэтому его окисление не требует преодоления никаких термодинамических препятствий. В ходе процесса ацетогенеза с использованием СО происходит наибольшее изменение свободной энергии ($\Delta G^{0'} = -175$ кДж/моль) по сравнению с другими С1-субстратами, такими как рассмотренная выше смесь СО₂ и Н₂ ($\Delta G^{0'} = -95$ кДж/моль), формиат ($\Delta G^{0'} = -99$ кДж/моль) или метанол ($\Delta G^{0'} = -74$ кДж/моль) (Moon et al., 2024). Окисление СО до СО₂ у ацетогенов, как и у остальных анаэробных микроорганизмов, катализируется Ni-содержащим ферментом СОДГ, осуществляющим следующее превращение:



Встречается два типа СОДГ: бифункциональная, являющаяся компонентом комплекса СОДГ/АКС в ПВЛ, и монофункциональная (CooS) (Ragsdale, 2000). Несмотря на то, что монофункциональная СОДГ считается основным катализатором окисления СО в клетке, *in vitro* продемонстрировано участие в этой реакции и бифункционального фермента (Carlson and Papoutsakis, 2017). Хотя достаточно низкий ОВП пары СО/СО₂ позволяет восстанавливать Fd_{окисл} напрямую, без использования бифуркационного механизма, образование других восстановительных эквивалентов для последующих этапов ацетогенеза осуществляется при участии бифуркационной гидрогеназы HydABC и Rnf- или Ech-комплексов, входящих в состав энергетического модуля ацетогенеза. Так, у Ech-содержащего ацетогена *T. kivui* полученный при окислении СО Fd_{восст} используется Ech-комплексом в Fd_{восст}-зависимой реакции восстановления Н⁺. Образованный Н₂ в дальнейшем окисляется бифуркационной гидрогеназой HydABC в ходе синтеза НАДН, а также HDCR в первой реакции метильной ветви ПВЛ (Рисунок 2А) (Schwarz et al., 2020). У *A. woodii*, использующего в энергетическом модуле Rnf-комплекс, окисление СО также приводит к восстановлению Fd_{окисл}, а образование НАДН происходит в ходе работы мембранного Rnf-комплекса (Рисунок 2Б) (Schwarz et al., 2020).

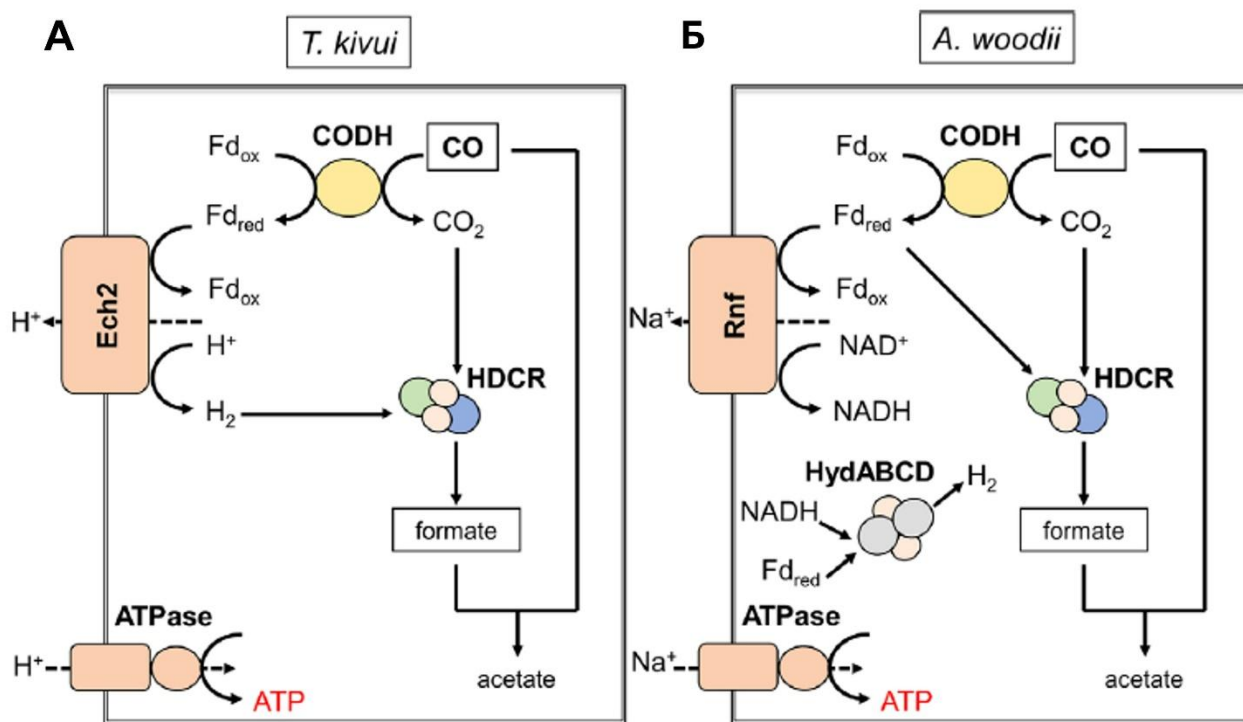
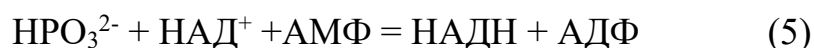


Рисунок 2 – Различные механизмы ацетогенеза при росте на CO у *T. kivui* (А) и *A. woodii* (Б). CODH – CO-дегидрогеназа; HDCR – H₂-зависимая CO₂-редуктаза; HydABC – бифуркационная гидрогеназа; Ech2, Rnf – первичные генераторы трансмембранного потенциала; ATPase – АТФ-синтаза (Цитировано по Schwarz et al., 2020).

3.1.1.3 Окисление фосфита

Наиболее энергетически эффективным донором электронов, известным на данный момент, является фосфит с $E^{0'}$ [$\text{HPO}_4^{2-}/\text{HPO}_3^{2-}$] = -670 мВ и $\Delta G^{0'}$ = -71,4 кДж/моль при восстановлении НАД⁺ (Roesl and Verstraete, 2001). Такой процесс доказан лишь для двух чистых культур: *D. phosphitoxidans* (Schink et al., 2002) и *Phosphitispora fastidiosa* (Mao et al., 2021). *D. phosphitoxidans* является ацетогенным микроорганизмом, на примере которого происходит активное изучение биохимических основ реакции. Последние исследования показали, что окисление HPO_3^{2-} сопряжено с восстановлением НАД⁺ и происходит при помощи АМФ-зависимой фосфитдегидрогеназы согласно уравнению (5) (Mao et al., 2023):

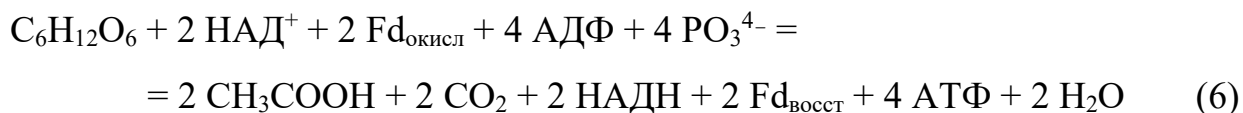


3.1.2 Окисление органических субстратов

Органотрофный рост ацетогенных прокариот обусловлен их способностью окислять широкий спектр органических соединений, таких как сахара, аминокислоты, ароматические метоксилированные соединения, спирты, органические кислоты и т. д. Ниже будут рассмотрены механизмы окисления наиболее распространенных из них.

3.1.2.1 Окисление углеводов

Основным способом окисления углеводов у большинства ацетогенных бактерий является путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (Ljungdahl and Wood, 1969; Roehlein et al., 2012). В ходе этого процесса окисление одной молекулы глюкозы приводит к образованию двух молекул пирувата, двух молекул НАДН и двух молекул АТФ, синтезированных за счет субстратного фосфорилирования. Последующее окислительное декарбоксилирование пирувата, катализируемое пируват:ферредоксин оксидоредуктазой, приводит к образованию двух молекул ацетил-КоА, двух молекул CO_2 и двух молекул $\text{Fd}_{\text{восст}}$ (Ragsdale, 2003). Далее обе молекулы ацетил-КоА превращаются в ацетат в ходе последовательных реакций, катализируемых фосфотрансацетилазой и ацетаткиназой, что сопряжено с образованием двух дополнительных молекул АТФ в результате субстратного фосфорилирования. Суммарная реакция окисления глюкозы в этом случае выглядит следующим образом:

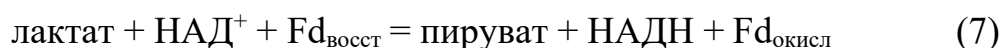


$\text{Fd}_{\text{восст}}$ и НАДН, образовавшиеся в молярном соотношении 1:1, затем расходуются в ПВЛ на восстановление двух молекул CO_2 , полученных в реакции (6), что приводит к синтезу третьей молекулы ацетата. При этом в энергетическом модуле ацетогенеза происходит образование $\approx 0,3$ моль АТФ в ходе окислительного фосфорилирования (Schuchmann and Müller, 2014). Таким образом, в результате ацетогенеза с глюкозой в качестве субстрата подавляющая часть АТФ образуется за счет субстратного фосфорилирования (4 моль АТФ), в связи с чем

долгое время ацетогенез считался одним из типов брожения, хотя в настоящее время показан и вклад окислительного фосфорилирования.

3.1.2.2 Окисление лактата

Окисление лактата с переносом электронов на НАД⁺ термодинамически невыгодно, поскольку стандартный ОВП пары лактат/пируват ($E^{0'} = -190$ мВ) менее отрицательный, чем у пары НАД⁺/НАДН ($E^{0'} = -320$ мВ) (Thauer et al., 1977). В связи с этим в окислительном модуле при росте на лактате функционирует бифуркационная лактатдегидрогеназа, осуществляющая следующую реакцию (Weghoff et al., 2015):



Генерация $\text{Fd}_{\text{восст}}$ для осуществления этой реакции бифуркации происходит в ходе последующего окислительного декарбоксилирования пирувата до ацетил-КоА и CO_2 :

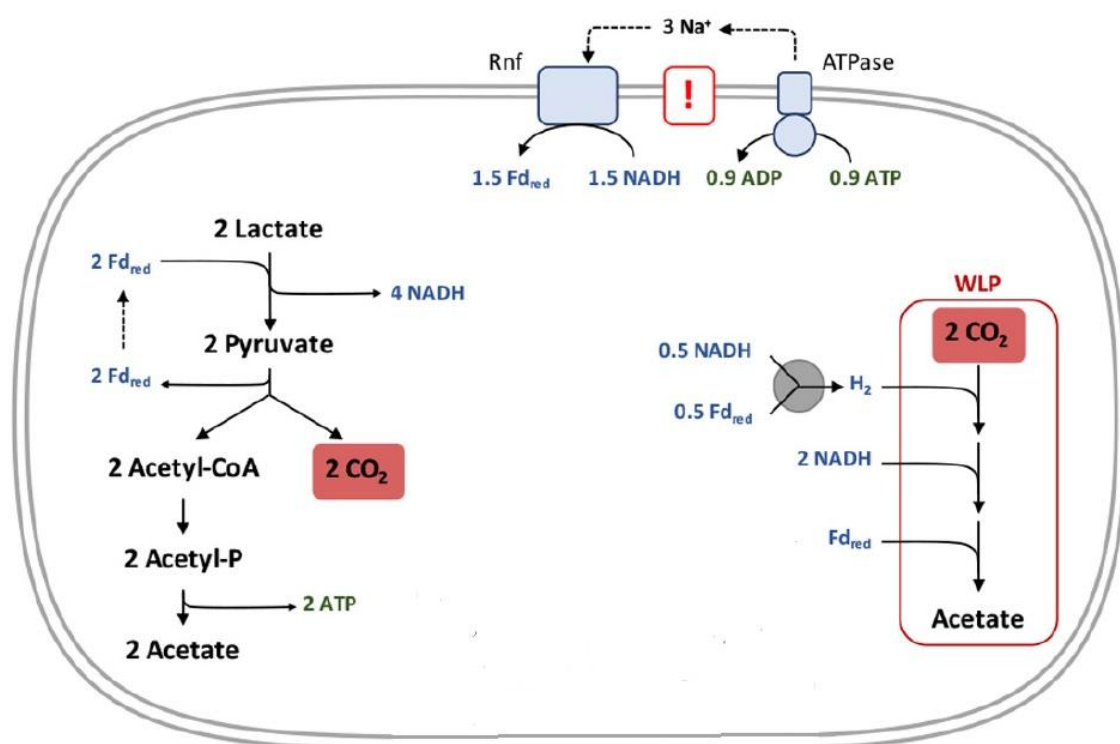


Рисунок 3 – Схема ацетогенеза при росте на лактате у *A. woodii*. WLP – путь Вуда-Льюнгдаля; Rnf – первичный генератор трансмембранного потенциала; ATPase – АТФ-синтаза (Цитировано по Schuchmann and Müller, 2016).

Образование необходимых для ПВЛ $Fd_{\text{восст}}$ и H_2 происходит как при функционировании бифуркационной трансгидрогеназы, так и в АТФ-зависимой реакции. Например, для *A. woodii* (Рисунок 3) показано, что в реакции НАДН-зависимого восстановления $Fd_{\text{окисл}}$ принимает участие мембранный Rnf-комплекс, работающий в направлении уменьшения трансмембранного потенциала, образуемого за счет гидролиза АТФ (Schuchmann and Müller, 2016).

3.1.2.3 Окисление спиртов

В анаэробных местах обитания спирты являются широко распространенной и многочисленной группой субстратов, однако их окисление возможно лишь при наличии в среде внешнего акцептора электронов или же синтрофного партнера (как правило, это или метаногенная архея, или сульфатредцирующая бактерия). В случае окисления спиртов ацетогенными микроорганизмами внешним акцептором электронов является CO_2 . Органотрофный рост ацетогенных прокариот на этаноле наиболее изучен для *A. woodii* (Eichler and Schink, 1984). Реакция окисления этанола с одновременным восстановлением $НАД^+$ (9) является эндотермической и имеет значение $\Delta G^{0'} = +22$ кДж/моль:



Несмотря на то, что $E^{0'}$ пары ацетальдегид/этанол (-197 мВ) сходен по значению с $E^{0'}$ пары пируват/лактат (-190 мВ), у *A. woodii* был выявлен механизм окисления этанола, отличный от электронной бифуркации, используемой при окислении лактата. Ключевую роль играет бифункциональный фермент ацетальдегид/алкогольдегидрогеназа, катализирующий двухстадийное превращение этанола в ацетат (Bertsch et al., 2015b). Данный фермент последовательно окисляет этанол до ацетальдегида, а затем, без высвобождения промежуточного продукта из активного центра, окисляет его до ацетил-КоА. Благодаря такому механизму внутриклеточная концентрация токсичного ацетальдегида остается чрезвычайно низкой. На обеих стадиях процесса в качестве акцептора электронов используется $НАД^+$. Возможность начальной эндотермической стадии обеспечивается за счет последующей экзотермической

реакции окисления ацетальдегида ($\Delta G^{0'} = -17$ кДж/моль) (Schuchmann and Müller, 2016). В результате суммарная реакция (10), катализируемая окислительным модулем ацетогенеза с этанолом в качестве субстрата, становится энергетически осуществимой:



Образование $\text{Fd}_{\text{восст}}$ осуществляется, как и в случае с использованием лактата в качестве донора электронов, в результате работы Rnf-комплекса. Синтезированный в реакциях ПВЛ ацетил-КоА в ходе фосфотрансацетилазной и ацетаткиназной реакций превращается в ацетат, что сопровождается образованием АТФ в ходе субстратного фосфорилирования.

При окислении метанола ацетогенные микроорганизмы осуществляют гетеролитический разрыв связи между атомом углерода и кислорода ОН-группы (Hagemeier et al., 2006). Образованная в результате этого CH_3 -группа переносится на тетрагидрофолат (ТГФ) при помощи метилтрансферазной системы (Stupperich and Konle, 1993; Kreft and Schink, 1994). Это препятствует образованию высокореактивного формальдегида, являющегося главной причиной токсичности метанола как субстрата. Метилтрансферазная система ацетогенов была впервые описана для *N. thermoacetica* (Das et al., 2007). По своему строению и механизму работы она сходна с метилтрансферазой метаногенных архей и состоит из трех компонентов: субстратспецифичной метилтрансферазы I, осуществляющей разрыв С-О связи метилированного субстрата, корриноидного белка (CoP), являющегося промежуточным акцептором CH_3 -группы, а также метилтрансферазы II, переносящей CH_3 -группу на конечный акцептор, которым в случае ацетогенов является ТГФ (Kreft and Schink, 1994; Kaufmann et al., 1997). Полученный метил-ТГФ затем окисляется до CO_2 в процессе, обратном реакциям метильной ветви ПВЛ, при помощи метилен-ТГФ-редуктазы, метил-ТГФ-дегидрогеназы и форматдегидрогеназы, что приводит к образованию восстановительных эквивалентов – НАД(Ф)Н и H_2 . Для генерации $\text{Fd}_{\text{восст}}$ используются бифуркационная гидрогеназа, трансгидрогеназа или Rnf-комплекс.

Помимо одноатомных спиртов, в качестве донора электронов *A. woodii* способен утилизировать и двухатомные спирты, такие как 2,3-бутандиол (Hess et al., 2015) и 1,2-пропандиол (Schuchmann et al., 2015). В рамках окислительного модуля 2,3-бутандиол сначала подвергается НАД⁺-зависимому окислению до ацетоина, катализируемому 2,3-бутандиолдегидрогеназой. Последующий этап катализирует ацетоиндегидрогеназа, осуществляя окислительное расщепление ацетоина с образованием двух продуктов: ацетил-КоА и ацетальдегида. Ацетальдегид далее окисляется НАД⁺-зависимой алкогольдегидрогеназой до ацетил-КоА. Генерация Fd_{восст} происходит аналогично варианту с окислением этанола (Hess et al., 2015).

3.1.2.4 Окисление метилированных и метоксилированных соединений

Помимо метанола, окисление которого было рассмотрено в предыдущем разделе, ацетогенные бактерии способны окислять широкий спектр химических соединений, содержащих СН₃-группу, например бетаин, метилхлорид, метиламины и т.д., а также метоксилированные ароматические соединения (МАС), содержащие метокси-группу (СН₃О-), например вератрол, (изо-) ваниллат, сириггат, синапинат, различные метоксибензоаты и метоксициннаматы (Daniel et al., 1991). Большинство ацетогенов, способных использовать перечисленные соединения в качестве субстрата, утилизируют лишь СН₃-группу по механизму, описанному для метанола, оставляя остальную структуру молекулы нетронутой. Однако некоторые представители этой физиологической группы, например *Sporobacter termitidis*, *Sporobacterium olearium*, *Parasporobacterium paucivorans* и *H. foetida*, могут осуществлять разрыв ароматического кольца в присутствии сульфида в качестве акцептора СН₃-группы, в результате чего происходит превращение МАС в ацетат, метантиол или диметилсульфид (Хомякова, Слободкин, 2023).

3.2 Восстановительный модуль

Восстановительный модуль ацетогенеза у всех известных до настоящей работы ацетогенных микроорганизмов представлен реакциями ПВЛ. В ходе этого

процесса две молекулы CO_2 восстанавливаются до ацетил-КоА, который, в свою очередь, превращается в ацетат в последующих трансацетилазной и ацетаткиназной реакциях. Суммарный энергетический выход восстановления CO_2 до ацетата равен нулю, так как одна молекула АТФ затрачивается в ходе 10-формил-ТГФ-синтезной реакции, но также одна молекула АТФ образуется в ходе ацетаткиназной реакции. В качестве донора электронов для восстановления CO_2 в ПВЛ используются $\text{Fd}_{\text{восст}}$ и НАДН, образовавшиеся в ходе окисления субстрата. Согласно стехиометрии ПВЛ для образования 1 моль ацетата требуется 1 моль $\text{Fd}_{\text{восст}}$ и 2 моль НАДН, в то время как в окислительном модуле эти восстановительные эквиваленты образуются в соотношении 1:1. Это приводит к накоплению $\text{Fd}_{\text{восст}}$ в клетке, который в последующем окисляется в энергетическом модуле ацетогенеза. ПВЛ является ключевым в обсуждении происхождения жизни и эволюции метаболизма, так как это единственный из семи известных на данный момент путей автотрофной фиксации углерода, который обеспечивает клетку не только органическим веществом, но и энергией.

В ПВЛ принято выделять две ветви. В метильной ветви одна молекула CO_2 последовательно восстанавливается до CH_3 -группы, связанной с ТГФ, выполняющим роль переносчика. В карбонильной ветви вторая молекула CO_2 восстанавливается до СО-группы. Продукты восстановления обеих ветвей подвергаются реакции конденсации друг с другом и коферментом А, в результате чего образуется ацетил-КоА, который является конечным продуктом данного пути. При ацетогенезе ацетил-КоА сначала трансформируется в ацетилфосфат с помощью фосфотрансацетилазы, а в последующем превращается в ацетат в ходе ацетаткиназной реакции. Если микроорганизм растет в автотрофных условиях, то часть ацетил-КоА расходуется на биосинтетические процессы.

3.2.1 Метильная ветвь пути Вуда-Льюнгаля

На первом этапе метильной ветви происходит преобразование CO_2 в формиат. У большинства ацетогенных прокариот данную реакцию катализирует молибден- или селеноцистеинсодержащая формиатдегидрогеназа (Ragsdale and

Pierce, 2008). В качестве доноров электронов могут выступать НАДН, НАДФН или $Fd_{\text{восст}}$ (Wang et al., 2013). У некоторых ацетогенных бактерий, таких как *A. woodii* и *T. kivui*, восстановление CO_2 до формиата происходит напрямую за счет молекулярного водорода, и катализирует данную реакцию HDCR (Schuchmann and Müller, 2014; Hess et al., 2014). Этот мультисубъединичный комплекс содержит формиатдегидрогеназную и гидрогеназную субъединицы, а также вспомогательные железосерные белки-переносчики электронов (Schuchmann and Müller, 2013). Наиболее сложно организовано восстановление CO_2 до формиата у '*C. autoethanogenum*', у которой формиатдегидрогеназа образует функциональный комплекс с $Fd_{\text{восст}}$ и НАДФ⁺-зависимой гидрогеназой и осуществляет реакцию за счет бифуркации электронов (Wang et al., 2013).

Образованный формиат вступает в АТФ-зависимую реакцию конденсации с ТГФ под действием 10-формил-ТГФ-синтетазы, в результате чего образуется 10-формил-ТГФ. Механизм этой реакции включает в себя образование в качестве интермедиата формил-фосфата, который затем подвергается нуклеофильной атаке N¹⁰-группой ТГФ (Majillano et al., 1989). Данная реакция не специфична для ПВЛ, а ее продукт играет важную роль в том числе в синтетических процессах клетки, являясь предшественником биосинтеза N-формилметионина и пуринов (MacKenzie, 1984).

Формил-ТГФ превращается в метилен-ТГФ в ходе реакций, катализируемых 5,10-метенил-ТГФ-циклогидролазой и 5,10-метилен-ТГФ-дегидрогеназой. У одних ацетогенов, например у *A. woodii* и *C. formicoaceticum*, эти два фермента являются монофункциональными и работают последовательно друг за другом (Moore et al. 1974; Ragsdale and Ljungdahl, 1984; Clark and Ljungdahl, 1982). У *N. thermoacetica* эти превращения происходят под действием одного бифункционального фермента (Ragsdale and Pierce, 2008). Причиной такого объединения циклогидролазы и дегидрогеназы, предположительно, является защита нестабильного метенил-ТГФ от гидролиза и доставка его в активный центр дегидрогеназы для восстановления до более стабильного метилен-ТГФ (Pelletier and MacKenzie, 1995; Pawelek et al., 2000). В качестве доноров электронов на этом этапе могут быть использованы как

НАДН (Ragsdale and Ljungdahl, 1984), так и НАДФН (Ragsdale and Pierce, 2008). Метилен-ТГФ может подвергаться дальнейшему восстановлению в ПВЛ, а может быть использован в биосинтезе аминокислот и пиримидинов.

На последней стадии метильной ветви ПВЛ 5,10-метилен-ТГФ превращается в метил-ТГФ под действием метилен-ТГФ-редуктазы. Данный фермент встречается у многих микроорганизмов и имеет разную четвертичную структуру. В настоящее время принято выделять четыре основных класса метилен-ТГФ-редуктаз. Наиболее просто устроены ферменты MetF-типа, представленные единственной субъединицей, которая одновременно связывает субстрат и осуществляет его восстановление, используя НАДН в качестве донора электронов (Wohlfarth et al., 1990). Метилен-ТГФ-редуктазы такого простого строения встречаются у микроорганизмов, использующих эту реакцию лишь для ассимиляции углерода. Для ацетогенов же характерно наличие двухсубъединичной метилен-ТГФ-редуктазы, в которой, помимо субъединицы MetF, встречается также субъединица MetV (Mock et al., 2014). Такой гетеродимер использует в качестве донора электронов $Fd_{\text{восст}}$ вместо НАДН (Yi et al., 2021). Третий вариант организации фермента представляет собой гетеротримерный комплекс, в котором к MetVF присоединяется дополнительная субъединица RnfC2. Последняя проявляет высокую степень сходства с НАДН-окисляющей частью Rnf-комплекса и возвращает ферменту способность использовать НАДН в качестве источника электронов (Bertsch et al., 2015a). Четвертый тип метилен-ТГФ-редуктаз, выделенный преимущественно на основании анализа геномных данных, образует комплекс с Hdr-подобными белками. Предположительно, именно такой фермент функционирует у *N. thermoacetica* и представляет собой крупный гексагетеромерный комплекс из MetVF и дополнительных белков, имеющих высокую степень сходства с субъединицами гетеродисульфидредуктазы HdrBCA и MvhD (Mock et al., 2014). Наличие метилен-ТГФ-редуктазы Hdr-типа предполагается и у *Sporomusa ovata* (Kremp et al., 2020), причем для этой цитохром- и хинон-содержащей бактерии предложен новый механизм запасания энергии,

основанный на функционировании ЭТЦ, содержащей метилен-ТГФ-редуктазу (Kremp et al., 2022).

3.2.2 Карбонильная ветвь пути Вуда-Льюнгаля

Гены, кодирующие ферменты карбонильной ветви ПВЛ зачастую собраны в единый генный кластер *acs* (Roberts et al., 1989). В данном кластере присутствуют гены, кодирующие субъединицы СОДГ/АКС комплекса, а именно СОДГ, АКС, 2 субъединицы корриноидного железосерного белка (CFeSP) и метилтрансферазу. В генном кластере *acs* также присутствуют гены *cooC* и *acsF* – гомологи *cooC* из *Rhodospirillum rubrum*, кодирующие факторы созревания СОДГ (Jeon et al., 2001).

На первом этапе работы СОДГ/АКС комплекса происходит перенос метильной группы, образовавшейся в метильной ветви ПВЛ, с ТГФ на CFeSP в ходе $\text{CH}_3\text{-ТГФ:CFeSP}$ метилтрансферазной реакции, в результате чего формируется комплекс $\text{CH}_3\text{-Co-CFeSP}$. Для успешного протекания реакции требуется, чтобы кобальт (Co), входящий в состав CFeSP, находился в наиболее восстановленном Co(I) состоянии. Co(I) высокореактивен и может быть легко окислен до Co(II), в результате чего осуществление метилтрансферазной реакции окажется невозможным. Обратное восстановление Co(II) до Co(I) происходит за счет $\bar{e}$, поступающего от [4Fe-4S]-кластера большой субъединицы CFeSP, который в свою очередь получает $\bar{e}$ от низкопотенциального $\text{Fd}_{\text{восст}}$. Таким образом, железосерный кластер принимает участие в активации Co, но не вовлечен напрямую в процесс переноса CH_3 -группы (Menon and Ragsdale, 1999).

СОДГ в ПВЛ относится к бифункциональным Ni-содержащим ферментам и осуществляет Fd-зависимое восстановление второй молекулы CO_2 до CO, в ходе которого образуется интермедиат CO-Ni-СОДГ. $\text{CH}_3\text{-Co-CFeSP}$ принимает участие в реакции трансметиличивания и отдает CH_3 -группу АКС, в результате чего формируется комплекс $\text{CH}_3\text{-Ni-АКС}$ (Seravalli et al., 2002). На заключительном этапе АКС катализирует реакцию конденсации CH_3 - и CO-групп с образованием промежуточного комплекса ацетил-Ni, который распадается с переносом

ацетильной группы на КоА, что приводит к образованию свободного ацетил-КоА (Ragsdale, 2007).

Ацетил-КоА превращается в ацетат в ходе двухстадийного процесса. Сначала фосфотрансацетилаза катализирует образование ацетилфосфата, который затем под действием ацетаткиназы преобразуется в ацетат, при этом происходит синтез 1 молекулы АТФ. Ацетил-КоА также может быть предшественником для широкого спектра других соединений, которые могут образовываться в качестве конечных продуктов метаболизма ацетогенов. К числу таких продуктов относятся этанол, бутанол, лактат, 2,3-бутандиол, ацетон, изобутилен, изопрен, однако биосинтез большинства из этих соединений сопряжен с затратами энергии и является энергетически невыгодным (Katsyv and Müller, 2020).

3.3 Энергетический модуль

Как было отмечено ранее, ПВЛ используется у ацетогенных бактерий для сброса e^- на CO_2 и опосредованно участвует в запасании энергии клеткой, используя НАДН и $Fd_{\text{восст}}$ в разных количествах, в результате чего в клетке образуется избыток $Fd_{\text{восст}}$. Именно $Fd_{\text{восст}}$ расходуется в энергетическом модуле, который у ацетогенных прокариот представлен мембраносвязанным комплексом, выполняющим роль первичного генератора ионного потенциала, и АТФ-синтазой, преобразующей электрохимический потенциал в макроэргические связи АТФ. Роль первичного генератора у различных представителей ацетогенов могут выполнять два альтернативных ферментных комплекса: $Fd:НАД^+$ -оксидоредуктаза (Rnf-комплекс) или энергозапасающая $[NiFe]$ -гидрогеназа (Ech-комплекс).

3.3.1 Первичные генераторы

3.3.1.1 Rnf-комплекс

У большого числа анаэробных прокариот создание трансмембранного градиента ионов происходит за счет работы Rnf-комплекса. Впервые *rnf*-гены были обнаружены у бактерии *Rhodobacter capsulatus*, в клетках которой они кодируют субъединицы мембранного комплекса, участвующего в фиксации азота, откуда и

появилось название комплекса – «*Rhodobacter nitrogen fixation*» (Schmehl et al., 1993), а затем этот генный кластер был обнаружен и у других анаэробов (Biegel and Müller, 2010). Rnf-комплекс катализирует окисление низкопотенциального $Fd_{\text{восст}}$, сопрягая этот процесс с восстановлением $НАД^+$ и преобразованием энергии окислительно-восстановительной реакции в электрохимический градиент ионов H^+ , как например у *C. ljungdahlii* (Tremblay et al., 2012), или Na^+ , как у *A. woodii* (Hess et al., 2013).

Комплекс состоит из шести субъединиц: две из них (RnfB и RnfC) локализованы в цитозоле и содержат сайты окисления $Fd_{\text{восст}}$ и восстановления $НАД^+$, остальные четыре субъединицы (RnfA, RnfD, RnfE и RnfG) интегрированы в мембрану и формируют путь для трансмембранного переноса $\bar{e}$, который непосредственно сопряжен с переносом ионов. Транспорт $\bar{e}$ через мембрану осуществляется благодаря наличию в составе комплекса железосерных кластеров и флавинов (Hreha et al., 2015).

Как было отмечено ранее, в условиях использования в качестве субстратов низкоэнергетических соединений (лактата, этанола, метанола) Rnf-комплекс может функционировать в направлении, обратном окислению $Fd_{\text{восст}}$: он использует энергию трансмембранного ионного градиента для обеспечения восстановления $Fd_{\text{окисл}}$ за счет окисления $НАДН$, благодаря чему поддерживается баланс окислительно-восстановительных эквивалентов в клетке и генерация $Fd_{\text{восст}}$ для восстановления CO_2 при помощи СОДГ (Westphal et al., 2018).

3.3.1.2 Ech-комплекс

Альтернативным энергетическим комплексом, обнаруженным у части ацетогенов, является Ech-комплекс (*E*nergy-*c*onverting *h*ydrogenase). Подобно Rnf-комплексу, Ech катализирует окисление $Fd_{\text{восст}}$. Ключевое различие заключается в акцепторе электронов: Ech использует H^+ вместо $НАД^+$, что приводит к образованию молекулярного водорода в качестве конечного продукта реакции. Данный ферментный комплекс относится к группе 4e [NiFe]-содержащих H_2 -образующих энергозапасующих мембраносвязанных гидрогеназ, которые

являются предшественниками комплекса I (НАДН-дегидрогеназы) дыхательной цепи (Vignais et al., 2001). Гидрогеназы из этой группы также считаются одними из наиболее древних энергозапасающих систем, так как в их составе присутствуют в качестве переносчиков $\bar{e}$ лишь железосерные кластеры, в то время как в Rnf-комплексе к ним добавляются более сложно устроенные флавины (Schoelmerich and Müller, 2020).

Ech-комплекс – это мембраносвязанная ион-транслоцирующая система, включающая от шести до четырнадцати субъединиц. Биологическая роль Ech-комплекса не ограничивается генерацией энергии, он также участвует в ключевых метаболических процессах, таких как синтрофное взаимодействие с другими микроорганизмами (Walker et al., 2009), а также образование $Fd_{\text{восст}}$ в ходе функционирования в обратном направлении с затратой энергии (Müller et al., 2018).

Как правило, в геномах ацетогенов присутствует лишь один из двух описанных энергетических комплексов. Тем не менее у некоторых представителей (*S. ovata*, *Clostridium scatologenes*) найдены генетические детерминанты обеих систем (Müller, 2019).

3.3.2 АТФ-синтаза

Сформированный Rnf- и Ech-комплексами электрохимический градиент ионов служит источником энергии для синтеза АТФ, катализируемого F_1F_o -АТФ-синтазой. Она представляет собой высокомолекулярный комплекс, способный преобразовывать энергию трансмембранного ионного градиента сначала в механическую энергию вращения мембранной части, а затем в химическую энергию макроэргических связей АТФ (Müller and Grüber, 2003). АТФ-синтаза состоит из двух функциональных модулей: трансмембранного F_o и цитоплазматического F_1 . F_1 -компонент состоит из трех α - и трех β -субъединиц, чередующихся друг с другом и соединяющихся с комплексом субъединиц $\gamma\delta\epsilon$. F_o -компонент у большинства бактерий состоит из субъединиц a , b и c в количественном соотношении 1:2:9–14, формирующих роторное кольцо (Müller and Grüber, 2003). Ионный градиент, образованный первичным генератором (Ech-

или Rnf-комплексом), расходуется за счет прохождения ионов через F_o . Это вызывает вращение ротора, а затем и $\gamma\delta\epsilon$ -комплекса, в результате чего на β -субъединицах F_1 -модуля синтезируется АТФ (Yoshida et al., 2001). Ионная специфичность АТФ-синтазы определяется связывающими сайтами на c -субъединицах модуля F_o , которые могут взаимодействовать с H^+ (Müller and Grüber, 2003; Meier et al., 2006) или с Na^+ (Meier et al., 2009; Brandt and Müller, 2015; Mayer et al., 2015).

Энергетическая эффективность процесса синтеза АТФ определяется строением роторного кольца. Поскольку каждый оборот ротора, необходимый для синтеза трех молекул АТФ, требует транспорта определенного числа ионов, ключевым параметром является количество c -субъединиц в кольце. В настоящее время среди ацетогенов эта величина экспериментально установлена только для *A. woodii*: его роторное кольцо состоит из 10 c -субъединиц, каждая из которых связывает Na^+ . Таким образом, для синтеза одной молекулы АТФ данный организм использует приблизительно 3,3 катиона Na^+ (Matthies et al., 2014).

3.4 Роль цитохромов и хинонов в метаболизме ацетогенных прокариот

Изложенный выше механизм запасания энергии был открыт не сразу. В 1975 году у *N. thermoacetica* были обнаружены цитохромы b -типа, в результате чего для всех ацетогенов был предположен механизм запасания энергии при участии цитохром-зависимой ЭТЦ (Gottwald et al., 1975; Hugenholtz and Ljungdahl, 1990). Однако наряду с цитохром- и хинонсодержащими ацетогенами обнаруживались организмы, не содержащие ни того, ни другого, а позднее для всех ацетогенов был постулирован описанный выше механизм синтеза АТФ в ходе функционирования Fd-зависимых Rnf-/Ech-комплексов и АТФ-синтазы (Schuchmann and Müller, 2014). Анализ распространения цитохромов в геномах известных ацетогенов, а также изучение физиологических характеристик микроорганизмов позволили предположить связь обнаруженных цитохромов со способностью микроорганизмов переключаться на восстановление альтернативных акцепторов электронов, таких как фумарат, ароматические акрилаты, неорганические

соединения серы, нитрат или нитрит (Rosenbaum and Müller, 2021). Например, цитохромы *c*-типа являются типичными для ЭТЦ, участвующей в восстановлении нитрата (Thauer et al., 1977), а цитохромы *b*-типа входят в состав дегидрогеназ и гидрогеназ, передающих $\bar{e}$ через мембраносвязанные переносчики (Das et al., 1989; Dobrindt and Blaut, 1996; Kröger et al., 2002).

Что касается участия цитохромов непосредственно в модулях ацетогенеза, наибольший интерес вызывает реакция восстановления метилен-ТГФ до метил-ТГФ, катализируемая метилен-ТГФ-редуктазой. ОВП пары метилен-ТГФ/метил-ТГФ составляет -200 мВ, в то время как ОВП пары НАД⁺/НАДН составляет -320 мВ (Wohlfarth and Diekert, 1991). В связи с этим при НАДН-зависимом восстановлении метилен-ТГФ выделяется большое количество энергии, которая может быть использована клеткой для формирования трансмембранного электрохимического потенциала (Thauer et al., 1977). В ходе подробного изучения биохимии процесса у цитохром-содержащей бактерии *S. sphaeroides* была выдвинута гипотеза участия цитохром *b*-содержащей периплазматической гидрогеназы в реакции, катализируемой мембраносвязанной метилен-ТГФ-редуктазой (Kamlage and Blaut, 1993; Dobrindt and Blaut, 1996). У этого микроорганизма гидрогеназа окисляет H₂ в периплазматическом пространстве, генерируя разность концентраций H⁺ по разные стороны от клеточной мембраны; электрон затем передается через цитохром *b* на метилен-ТГФ-редуктазу, которая в свою очередь восстанавливает метилен-ТГФ. Синтез АТФ осуществляется за счет электрохимического трансмембранного потенциала, создаваемого в ходе деятельности гидрогеназы (Rosenbaum and Müller, 2021). Гипотеза о функционировании подобного механизма метилен-ТГФ-редуктазы была также предложена для цитохром- и хинон-содержащей ацетогенной бактерии *Ta. phaeum*, у которой донором электронов для предполагаемой ЭТЦ служит формиат (Keller et al., 2019). Подобная модель была предположена и для *N. thermoacetica*, однако в этом случае трансмембранный градиент, скорее всего, формируется в ходе векторного переноса H⁺, сопряженного с этой реакцией (Mock et al., 2014). Долгое время гипотеза об ЭТЦ, содержащей в своем составе метилен-ТГФ-редуктазу,

оставалась недоказанной, так как изучение этого фермента у различных ацетогенов показало его присутствие лишь в растворимой фракции клеток. Однако подробное исследование метаболизма *S. ovata* позволило доказать функционирование такого типа ЭТЦ у ацетогенов. У этой ацетогенной бактерии метилен-ТГФ-редуктаза связана с мембранными белками MvhD и HdrCBA и получает электроны от H_2 через цитохром *b* и, возможно, хиноны. Реакция обратима и служит для того, чтобы обеспечить энергией термодинамически невыгодный процесс окисления метильных групп при росте *S. ovata* на метаноле. Такая ЭТЦ обеспечивает дополнительный синтез 0,5 моль АТФ на 1 моль метилен-ТГФ и, вероятно, является третьим типом запасаения энергии у ацетогенных бактерий в дополнение к Rnf- и Ech-комплексам (Kremp et al., 2022).

ГЛАВА 4. АЦЕТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Уникальной особенностью ацетогенных бактерий является их способность использовать в качестве субстратов H_2/CO_2 , CO или синтез-газ, являющиеся компонентами отходящих газов промышленных производств, в первую очередь металлургических и углевыжигательных предприятий, и превращать их органические соединения, в основном в ацетат (Latif et al., 2014). Это делает ацетогенов перспективной платформой для разработки биотехнологических подходов утилизации синтез-газа, которые бы позволили не только преобразовывать дешевое сырье в ценные химические продукты, но и уменьшить количество выбросов отходящих газов предприятий. Однако низкие скорости роста и малый прирост биомассы, связанные с термодинамическими ограничениями хемолитоавтотрофного ацетогенеза, осложняют масштабирование проводимых лабораторных исследований по получению более сложных, чем ацетат, химических веществ с использованием ацетогенных бактерий. Для успешного развития этих технологий требуется решение ряда проблем, речь о которых пойдет ниже.

4.1 Преобразование синтез-газа и его компонентов с использованием ацетогенных бактерий

Смесь CO_2 , H_2 и CO в разных соотношениях, называемая синтез-газом, не только входит в состав отходящих газов многих производств, но и может быть промежуточным звеном в переработке отходов лигноцеллюлозной промышленности и других отраслей, продуцирующих большое количество органического вещества в виде побочных продуктов. В ходе процесса газификации, при котором биомасса подвергается окислению при температурах 600–900°C в присутствии определенных концентраций O_2 или воздуха, происходит образование синтез-газа, отличающегося повышенной долей H_2 и CO в составе (Richardson et al., 2012). Химические подходы преобразования синтез-газа в жидкие химические соединения, например процесс Фишера-Тропша, требуют особых условий, в том числе присутствия в среде определенных катализаторов, создания высокого давления и высоких температур в системе (Latif et al., 2014). Биокаталитическая

ферментация не требует затрат большого количества энергии и других ресурсов на создание таких жестких условий, а также обладает иными преимуществами, такими как высокая толерантность процесса к загрязнителям в составе синтез-газа, например к присутствию серосодержащих соединений, способность использовать смесь газов самого разного состава и повышенная степень стереоселективности катализируемых реакций (Latif et al., 2014).

Основным продуктом метаболизма большинства ацетогенов является ацетат, однако это химическое соединение обладает низкой стоимостью и успешно синтезируется химическим путем, в связи с чем усилия биотехнологии направлены на разработку подходов биокаталитического получения более сложных соединений, например этанола. Мировым лидером по ацетогенной биоконверсии синтез-газа в этанол является международная компания LanzaTech. География заводов компании постоянно растет, на данный момент LanzaTech сотрудничает с металлургическими заводами ArcelorMittal (Бельгия), IndianOil Corporation (Индия), Hebei Shoulang New Energy, Technology Co., Ltd, Ningxia Shoulang Jiuyan New, Energy Technology Co., Ltd, Guizhou Jinze New Energy, Technology Co., Ltd, Ningxia Binze New Energy, Technology Co., Ltd и Henan Sailongtu Bio-technology Co., LtdB (Китай) (Poehlein et al., 2025). В технологии LanzaTech используется природный штамм '*C. autoethanogenum*', способный превращать синтез-газ в этанол при высоком парциальном давлении СО. Нынешняя схема процесса позволяет каждому заводу компании конвертировать в этанол в среднем более 50000 тонн синтез-газа (Poehlein et al., 2025). Такая технология позволяет не только получать биотопливо 4-го поколения, но и использовать образованную биомассу ацетогенов в качестве кормовой добавки (Zhang et al., 2023). Однако несмотря на значительный прогресс в области ферментации синтез-газа для производства этанола, все еще существуют технологические проблемы, приводящие к относительно низкой экономической выгоде. Наиболее энергозатратными этапами процесса являются сжатие газа и осуществление его постоянной активной циркуляции, что необходимо для повышения эффективности массообмена (Zhang et al., 2023). Для решения этой проблемы требуется оптимизация технологии

массообмена для снижения энергопотребления (Fan et al., 2021). Также в этом процессе в качестве донора электронов используется CO, что приводит к окислению 75% CO до CO₂, выбрасываемого впоследствии в атмосферу (Zhu et al., 2020). В связи с этим существует необходимость в разработке технологий, использующих в качестве донора электронов H₂, что позволит уменьшить эмиссию CO₂ в атмосферу (Poehlein et al., 2025).

На данный момент большая часть исследований направлена на разработку технологий по получению более сложных, чем этанол, соединений, таких как бутанол, гексанол, изопропанол, 2,3-бутандиол, битират, 3-гидроксипропионат, гексоноат, мевалонат, изопрен, аминокислоты, тиамин, пантотенат и другие (Bengelsdorf et al., 2018; Müller, 2019). Штаммы ацетогенов, осуществляющие такое превращение, могут быть получены при помощи генной инженерии. В настоящее время наиболее изученными с точки зрения генной инженерии являются ацетогенные бактерии *A. woodii*, '*C. autoethanogenum*', *C. ljungdahlii*, *Eubacterium limosum* и *T. kivui*. Конструирование плазмид для этих организмов включает поиск подходящих точек начала репликации, конститутивных и индуцируемых промоторов, репортерных белков, генетических элементов для делеций и вставок генов, а также рекомбинантных метаболических путей для получения ценных продуктов (Poehlein et al., 2025).

Термодинамические расчеты показывают, что большинство реакций, необходимых для превращения ацетил-КоА в сложные химические соединения, являются эндотермическими и могут привести к дефициту энергии в клетке (Bertsch and Müller, 2015a). В связи с этим активно развивается и другой способ расширения спектра получаемых из синтез-газа и других C1-соединений продуктов, а именно культивирование смешанных культур. В природных местах обитания ацетогенные бактерии взаимодействуют с другими микроорганизмами, которые могут обеспечивать ацетогенов необходимыми питательными веществами и факторами роста, поглощать продукты метаболизма ацетогенов, создавая тем самым благоприятные термодинамические условия для протекания этого процесса, или способствовать удалению из среды ингибиторов и токсичных соединений

(Poehlein et al., 2025). В связи с этим смешанные культуры – природные или синтетические – обладают потенциалом для получения более разнообразного спектра продуктов, что достигается благодаря сочетанию в них микроорганизмов с автотрофным и гетеротрофным метаболизмом (Poehlein et al., 2025). Первой подобной синтетической бинарной культурой является комбинация '*C. autoethanogenum*', синтезирующей ацетат и этанол, и *C. kluyveri*, использующей продукты ацетогенеза партнера для синтеза карбоновых кислот средней длины, например бутирата и гексаноата. На поздних этапах процесса также происходит образование бутанола и гексанола в результате восстановления кислот ацетогенным микроорганизмом (Diender et al., 2016). Другим перспективным гетеротрофным партнером для хемолитоавтотрофных ацетогенов может являться *C. kluyveri* (Richter et al., 2016; Diender et al., 2019; Bäumlér et al., 2023; Fernández-Blanco et al., 2022; Zhang et al., 2023). Тем не менее, несмотря на успех лабораторных исследований в области совместного культивирования для конверсии C1-газов, промышленного масштабирования этой методики еще не произошло. Совместное применение методов генной инженерии для получения штаммов автотрофных ацетогенов с необходимыми свойствами и дальнейшей разработки технологий совместного культивирования ацетогенов с ацетат-потребляющими бактериями может позволить осуществлять 100%-ную конверсию синтез-газа во многие биотехнологически ценные соединения (Poehlein et al., 2025).

Другое важное направление практического применения ацетогенов связано с их способностью использовать H_2 в качестве донора электронов. Водород рассматривается в биотехнологии как перспективный альтернативный источник энергии (Brandon and Kurban, 2017), однако серьезным препятствием для его широкого внедрения остаются сложности хранения и транспортировки этого высокореакционного газа. В качестве одного из решений проблемы предлагается химическое гидрирование CO_2 с получением формиата, но такой химический синтез требует высоких значений температуры и давления (Beller and Bornscheuer, 2014). Альтернативой такому сложному процессу служит биоконверсия смеси H_2+CO_2 в формиат с использованием ферментов, выделенных из ацетогенных

бактерий. Наибольший интерес вызывают штаммы, содержащие фермент HDCR. Например, HDCR из *A. woodii* катализирует эту реакцию при 30 °C и парциальном давлении 0,8 атм H₂ и 0,2 атм CO₂, достигая частоты оборотов 101600 ч⁻¹, что значительно превышает скорость химического катализа (Eppinger and Huang, 2017; Jeletic et al., 2013).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 5. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

5.1 Объекты исследования

Объектами исследования являлись смешанные пробы воды и осадков термальных источников Курило-Камчатского региона (2019 г.) и Байкальской рифтовой зоны (2024 г.), термальные воды Ессентукского месторождения минеральных вод (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.

5.2 Методы исследования

5.2.1 Культивирование ацетогенных бактерий

Среда Пфеннига. В большинстве случаев для культивирования чистых и накопительных культур ацетогенных бактерий применялась модифицированная среда Пфеннига (Pfennig, 1965). Среду готовили на основе стоковых растворов следующего состава (г/л):

<u>Раствор 1:</u>	MgCl ₂ ·2H ₂ O	33
	CaCl ₂ ·6H ₂ O	33
	KCl	33
<u>Раствор 2:</u>	KH ₂ PO ₄	33
	NH ₄ Cl	33

Раствор 1 и раствор 2 вносили в количестве 10 мл на 1 л дистиллированной воды. Кроме того, на 1 л дистиллированной воды вносили по 1 мл растворов витаминов и микроэлементов.

Раствор микроэлементов (Кевбрин, Заварзин, 1992) (мг/л):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (соль Мора)	784
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	238
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	395
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	24
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	144
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2
Na_2SeO_4	94
HBO_3	6
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	99

Раствор витаминов по Волину (Wolin et al., 1963) (мг/л):

биотин	20
фолиевая кислота	20
пиридоксин гидрохлорид	100
рибофлавин	50
тиамин	50
никотиновая кислота	50
пантотеновая кислота	50
B_{12}	1
p-аминобензойная кислота	50
тиоктовая кислота	50

Методика приготовления жидкой среды в анаэробных условиях. Базовую среду готовили с добавлением резазурина в конечной концентрации 1 мг/л. Смесь доводили до кипения, кипятили в течение 5 минут и затем охлаждали на водяной бане в атмосфере CO_2 . После охлаждения в среду добавляли растворы

микроэлементов и витаминов. Далее в качестве восстановителя в среду вносили $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ в концентрации 1 г/л, в результате чего происходило понижение ОВП среды и обесцвечивание резазурина. Для эксперимента по проверке зависимости культур от присутствия Na^+ в среде вместо $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ в качестве восстановителя использовали раствор цистеина (3 мМ) в соляной кислоте. После обесцвечивания резазурина подводили pH среды до необходимого значения с помощью 6N 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 бутылки объемом 1 л, заполняя их 400 мл среды. При культивировании в двухлитровых бутылках их заполняли 1 л среды.

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%. Необходимый состав газовой фазы создавали до стерилизации.

Нерастворимые субстраты вносили перед стерилизацией, а растворимые субстраты и антибиотики добавляли непосредственно в пробирки после стерилизации.

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.

Методика приготовления анаэробных жидких сред с нейтральным и щелочным pH для проб с низкой минерализацией. В данном случае также использовали модифицированную среду Пфеннига со сниженным содержанием солей и измененным количественным соотношением. Среда имела следующий состав (г/л):

KH_2PO_4	0,2
$\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1
NH_4Cl	0,5
KCl	0,2

В полученный раствор добавляли резазурин и кипятили в течение 5 минут, после чего охлаждали среду под током N_2 . После охлаждения добавляли 0,5 г/л Na_2CO_3 в качестве источника углерода и акцептора электронов для ацетогенных бактерий. Остальные манипуляции осуществляли так же, как и в описанной выше методике.

Анаэробное культивирование на твердой питательной среде. Для определения способности культур ацетогенных бактерий образовывать колонии на твердой питательной среде в пробирки Хангейта с анаэробно приготовленной жидкой средой Пфеннига добавляли желирующий агент: агарозу, агар (в концентрации 2,5 % каждого) или гельрит (1,5 %). В пробирки Хангейта вносили по 3 мл питательной среды, а следовательно объем газовой фазы составлял 14 мл. Состав газовой фазы варьировали, добавляя H_2 и CO_2 в соотношениях 4:1, 1:1 или 1:4.

Ростовые субстраты и акцепторы электронов. Способность выделенных чистых культур утилизировать различные субстраты оценивали с использованием следующих органических соединений, вносимых в виде стерильных растворов непосредственно в пробирки: 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, глицерол (каждый в концентрациях 5, 20 и 40 мМ), 2-метоксифенол, 3,4-диметоксибензоат, 2-метоксибензоат, фосфит (каждый в концентрациях 1, 5 и 10 мМ), дрожжевой экстракт, мясной экстракт, пептон, триптон, крахмал, пектин, декстрин, ксилан, целлюлоза (каждый в концентрациях 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 элементарную 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).

5.2.2 Получение накопительных и чистых культур хемолитоавтотрофных ацетогенных бактерий

Накопительные культуры хемолитоавтотрофных ацетогенных бактерий получали на селективных средах в атмосфере H_2/CO_2 .

Для выделения чистых культур применяли следующие подходы: метод последовательных десятикратных разведений в жидкой среде, метод агаровых столбиков, селекцию по температуре культивирования.

При использовании метода агаровых столбиков среду с добавленным агаром расплавляли на водяной бане, охлаждали до 50 °С, после чего производили посев. Пробирки с внесенной культурой оставляли при комнатной температуре до полного застывания агара, а затем ставили на инкубацию в термостат.

5.2.3 Изучение морфологии и тонкого строения клеток

Световая микроскопия. Наблюдение за ростом и изучение морфологии клеток осуществляли с помощью светового микроскопа Olympus CX-41, оснащенного фазово-контрастным устройством. Для количественного учета клеток определяли их количество в 20 независимых полях зрения (диаметр поля 0,17 мм) и вычисляли среднее арифметическое значение. При приготовлении препарата на чистое предметное стекло наносили 2 мкл исследуемой культуры и накрывали каплю покровным стеклом размером 18×18 мм. Плотность клеток X (количество клеток в 1 мл среды) определяли по формуле:

$$X = \frac{N * S * 10^9}{\pi * R^2 * V},$$

где N – среднее число клеток в одном поле зрения; S – площадь покровного стекла, мм²; R – радиус поля зрения, мкм; V – объем нанесенной капли культуральной жидкости, мкл.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Исследование тонкого строения клеток выполняли совместно с к.б.н. Н.А. Кострикиной (Центр коллективного пользования «Коллекция уникальных и экстремофильных микроорганизмов различных физиологических групп биотехнологического назначения UNIQEM», ФИЦ Биотехнологии РАН). Наблюдения проводили на трансмиссионном электронном микроскопе Jeol JEM-1400 (Jeol, Япония). Негативное контрастирование препаратов целых клеток осуществляли с использованием фосфовольфрамовой кислоты (pH 3,5). Приготовление ультратонких срезов осуществляли на микротоме LKB-3R (LKB Produkter, Швеция). Фиксацию клеток и подготовку образцов выполняли по стандартным методикам. Срезы контрастировали 3% водным раствором уранилацетата.

5.2.4 Определение удельной скорости роста

Удельную скорость роста (μ) для исследуемых культур рассчитывали по стандартному уравнению экспоненциального роста:

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1},$$

где N_1 , N_2 – количество клеток в момент времени t_1 , t_2 соответственно; t_1 , t_2 – время снятия точек, ч.

Расчет выполняли по данным логарифмической фазы роста культуры.

5.2.5 Методы аналитической химии

Определение количества сульфида. Концентрацию сульфида измеряли колориметрическим методом с N,N-диметил-п-фенилендиаминем в модификации Трюпера и Шлегеля (Trüper and Schlegel, 1964). К 30 мкл жидкой пробы или 300 мкл пробы газовой фазы добавляли 500 мкл 5% раствора ацетата цинка для осаждения сульфид-ионов в виде ZnS. Затем последовательно вносили 1260 мкл дистиллированной воды, 200 мкл 0,2% раствора N,N-диметил-п-фенилендиамина в 20% серной кислоте и 10 мкл 10% раствора сульфата железа(II)-аммония в 2% серной кислоте. После тщательного перемешивания реакционную смесь инкубировали 15 минут при комнатной температуре для развития стабильной

синей окраски. Оптическую плотность окрашенных растворов измеряли на спектрофотометре Beckman модель 35 (США) при длине волны 670 нм. Количественное содержание сульфида рассчитывали по калибровочному графику.

Определение количества H_2 , CO_2 и CO осуществляли методом газовой хроматографии на хроматографе «Хроматэк Кристалл 5000.2». Для разделения использовали две насадочные колонки. Для анализа H_2 применяли колонку с цеолитом NaX (фракция 60/80, 3 м × 2 мм; Хроматэк, Россия), а для анализа CO_2 и CO – колонку Hayesep Q (фракция 80/100, 3 м × 2 мм; Хроматэк, Россия). Анализ проводили в изотермическом режиме при 40 °С, в качестве газа-носителя использовали аргон.

Определение количества летучих жирных кислот в образцах осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Agilent Infinity 1260-II (Agilent Technologies, США), оснащенный рефрактометрическим детектором. Разделение проводили на колонке Aminex HPL-87H (300 × 7,8 мм; Bio-Rad Laboratories, США) с предколонкой Micro-Guard Cation H (Bio-Rad Laboratories, США). В качестве подвижной фазы использовали бидистиллированную воду с добавлением 0,005 М серной кислоты. Скорость потока составляла 0,6 мл/мин, объем вводимой пробы – 10 мкл. Образцы перед анализом центрифугировали (13 000 об/мин, 20 мин), супернатант подкисляли 10% раствором H_2SO_4 до pH 2,0.

Для количественного анализа применяли метод абсолютной калибровки по стандартам. Градуировочные зависимости строили на основе данных, полученных в трех повторностях для каждого калибровочного раствора.

Определение концентрации сульфат-, нитрат-, нитрит-, перхлорат- и хлорид-ионов осуществляли методом ионной хроматографии на хроматографе «Стайер» (Аквилон, Россия) с колонкой IonPack AS4-ASC (Dionex, США) и кондуктометрическим детектором. Элюирование проводили раствором HCO_3^- (1,36 мМ) / CO_3^{2-} (1,44 мМ) со скоростью потока 1,5 мл/мин.

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 (Trace GC Ultra DSQ II, Thermo Fisher Scientific, США; колонка HP-5MS, $E_I = 70$ эВ). Анализу подвергали метиловые эфиры жирных кислот, полученные обработкой 10 мг лиофилизированной биомассы безводным раствором HCl в метаноле по методу, описанному ранее (Mori et al., 2003). Полярные липиды исследовали с помощью двумерной тонкослойной хроматографии (ТСХ) в соответствии с опубликованной методикой (Slobodkina et al., 2013). Для анализа дыхательных липохинонов клетки разрушали растиранием в жидком азоте, после чего хиноны экстрагировали ледяным ацетоном. Полученный экстракт разделяли методом ТСХ. Целевые полосы вырезали из хроматографической пластинки и идентифицировали содержащиеся в них соединения по массам молекулярных ионов с помощью тандемной масс-спектрометрии (Finnigan LCQ Advantage MAX, Thermo Fisher Scientific, США).

5.2.6 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка и визуализация полученных данных осуществлялись с помощью программы Microsoft Excel (версия 2603) и с использованием библиотеки ggplot2 в среде RStudio.

5.2.7 Выделение ДНК

5.2.7.1 Выделение ДНК из природных образцов и накопительных культур

В ходе отбора проб из природных источников образцы фиксировали в стабилизирующем буфере следующего состава: 100 мМ ЭДТА, 100 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl.

Экстракцию ДНК из образцов, отобранных в горячих источниках Камчатки, и полученных накопительных культур проводили с помощью набора DNeasy PowerLyzer Microbial Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Экстракцию ДНК из образцов, отобранных в горячих источниках Байкальской рифтовой зоны и скважине 75-бис Ессентукского месторождения минеральных вод, а также из соответствующих накопительных культур осуществляли с помощью набора FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, США) в соответствии с инструкцией производителя.

5.2.7.2 Выделение геномной ДНК из чистых культур

Экстракцию ДНК для последующего секвенирования проводили по модифицированному протоколу с использованием фенол-хлороформной методики. Процедура состояла из следующих основных этапов:

1. Лизис клеток. Клеточную биомассу осаждали центрифугированием (13 000 об/мин, 5 мин). Осадок ресуспендировали в 300 мкл TSE-буфера (0,1 М NaCl, 0,1 М Tris-HCl, 0,1 М ЭДТА; pH 8,0) и обрабатывали 40 мкл раствора лизоцима (20 мг/мл) в течение 30 мин при +37 °C. Для полного лизиса добавляли 40 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия и 40 мкл раствора протеиназы К (50 мкг/мл). Смесь инкубировали в термошейкере при +50 °C в течение 50 мин, а затем при +60 °C в течение 10 мин для инактивации фермента.
2. Осаждение белков и прочих органических примесей. К лизату добавляли 100 мкл 5 М охлажденного раствора NaCl и инкубировали 20 мин при +4 °C. Вносили по 300 мкл охлажденного хлороформа и фенола, тщательно перемешивали в течение 5 мин и центрифугировали (5 000 об/мин, 15 мин). Верхнюю водную фазу, не касаясь интерфазы, переносили в новую пробирку. Для дополнительной очистки добавляли равный объем хлороформа, перемешивали и центрифугировали (5 000 об/мин, 15 мин), после чего снова отбирали верхнюю водную фазу.
3. Осаждение и отмывка ДНК. К очищенной водной фазе добавляли 0,1 объема 3 М раствора ацетата натрия и 2 объема охлажденного 96% этанола. Смесь перемешивали и выдерживали 12 ч при –20 °C для осаждения нуклеиновых кислот. Осадок отделяли центрифугированием (13 000 об/мин, 15 мин),

супернатант удаляли. Осадок ресуспендировали в 500 мкл 70% этанола, центрифугировали и аккуратно отбирали супернатант. Затем ресуспендировали осадок в 500 мкл 96% этанола, центрифугировали и удаляли супернатант.

4. Полученный осадок ДНК высушивали на воздухе и ресуспендировали в 70 мкл TE-буфера (10 mM Tris-HCl, 0,1 M ЭДТА; pH 8,0).

Для секвенирования на платформе Oxford Nanopore ДНК, выделенную фенол-хлороформным методом, подвергали повторной очистке с помощью набора MagAttract HMW DNA Kit (Qiagen, Германия), чтобы обогатить препарат высокомолекулярной фракцией и избавиться от сопутствующих примесей.

5.2.7.3 Определение концентрации ДНК

Концентрацию выделенной ДНК определяли с помощью набора Qubit dsDNA HS Assay Kit и флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя.

5.2.8 Таксономическое профилирование микробных сообществ

Секвенирование для анализа микробного состава накопительных культур было произведено сотрудниками Отдела биологии экстремофильных микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН к.б.н. А.А. Клюкиной и к.б.н. А.Ю. Меркелем.

5.2.8.1 Подготовка библиотек гена 16S рРНК для высокопроизводительного секвенирования

Для образцов горячих источников Камчатки и скважин Ессентукского месторождения минеральных вод, а также для полученных из них накопительных культур библиотеки ампликонов, соответствующих вариабельному участку V4 гена 16S рРНК, готовили согласно методике Gohl et al. (2016), используя систему праймеров 515F (5'-GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3'; Hugerth et al., 2014) и Pro-mod-805R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'; Merkel et al., 2019). Для образцов

горячих источников Байкальской рифтовой зоны и полученных из них накопительных культур готовили библиотеки ампликонов, соответствующих участкам V3–V4 гена 16S рРНК. Для этого использовали систему праймеров 341F (5'-CCTAYGGGDBGCWSCAG-3'; Frey et al., 2016) и Pro-mod-805R (5'-GACTACNVGGGTMTCTAATCC-3'; Merkel et al., 2019). Праймеры также содержали технические последовательности (Fadrosh et al., 2014). Для каждого образца библиотеки готовили в двух технических повторностях.

5.2.8.2 Высокопроизводительное секвенирование на платформе Illumina

Высокопроизводительное секвенирование библиотек, полученных на предыдущей стадии, проводили с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kit v2 (500 Cycles), MS-102-2003 (Illumina, США) на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) в соответствии с инструкцией производителя.

5.2.8.3 Анализ филогенетического разнообразия прокариот

Для определения относительной представленности таксонов микроорганизмов в исследуемых пробах полученные в ходе секвенирования прочтения (после всех процедур отсева некачественных прочтений и отрезания технических последовательностей) анализировали с помощью сервиса SILVAngs (<https://ngs.arb-silva.de/silvangs/>; база данных SILVA138.2, Version: 1.9.10/1.4.9).

5.2.9 Определение полных последовательностей геномов чистых культур

Секвенирование геномов проводили двумя методами для осуществления высококачественной гибридной сборки геномов *de novo*. На первом этапе геномную ДНК обрабатывали ультразвуком с помощью устройства CovarisS2 (Covaris, США) с параметрами, отрегулированными для получения фрагментов размером 400 п.н. Полученные фрагменты ДНК использовали для приготовления библиотек с применением набора NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina® (E7645, NEB, США) в соответствии с инструкциями производителя. Секвенирование проводили на приборе Illumina HiSeq2500. На втором этапе было

проведено секвенирование с использованием технологии Oxford Nanopore. Другую аликвоту ДНК очищали с использованием набора MagAttract HMW DNA Kit (Qiagen, Германия) для обогащения фракции ДНК с высокой молекулярной массой, а также для оптимизации соотношения A260/A280 и A260/A230. Библиотеку ДНК готовили с использованием набора Rapid Barcoding Kit (SQK-RBK004, Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Секвенирование выполняли с помощью проточной кюветы FLO-MIN-106D (R9.4.1). Преобразование сырого сигнала в нуклеотидные последовательности выполняли с использованием программы Guppy v2.3.5 (модель flip-flop). Сборку генома de novo выполняли на основе длинных прочтений, полученных методом секвенирования на платформе MinION, с использованием программы Canu assembler v. 1.9 (Koren et al., 2017). Затем собранный контиг подвергали двухэтапной коррекции: сначала с использованием сырых прочтений MinION при помощи программы Nanopolish (Loman et al., 2015), а затем – высокоточных коротких прочтений Illumina с помощью программы Pilon (Walker et al., 2014). Для дальнейшего улучшения качества сборки была выполнена гибридная сборка de novo в программе SPAdes версии 3.13.0 (Prjibelski et al., 2020) с использованием как длинных, так и коротких прочтений.

5.2.10 Аннотация геномов

Первичную автоматическую аннотацию геномов выполняли с помощью Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP; Tatusova et al., 2016) при загрузке геномных последовательностей в базу данных NCBI. Для уточнения функций предсказанных белков использовали дополнительные инструменты: IMG/MER System (Chen et al., 2017), Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST; Brettin et al., 2015). Корректировку результатов автоматизированной аннотации и других предсказаний осуществляли вручную согласно ранее описанному подходу (Toshchakov et al., 2015). Поиск мобильных элементов выполняли с помощью пакета *isescan* (Xie and Tang, 2017), идентификацию и аннотацию генов, ассоциированных с бактериофагами, – с использованием сервера PHASTer (Arndt et al., 2016). Предсказание геномных островов производили с помощью веб-

инструмента IslandViewer 4 (Bertelli et al., 2017). Распознавание систем защиты осуществляли с применением инструмента defense finder (Tesson et al., 2022), а поиск кластеров биосинтетических генов – с помощью веб-сервера antiSMASH (Blin et al., 2019).

Для определения значений ANI (средняя нуклеотидная идентичность) использовали модуль для Python pyani, а для определения значений AAI (средняя аминокислотная идентичность) – AAI-matrix калькулятор (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/g-matrix/index>).

5.2.11 Филогенетический анализ

Филогенетический анализ проводили на основе набора из 120 консервативных маркерных белков (bac120; Parks et al., 2020). Для анализа штамма 3443-3Ac^T белковые последовательности идентифицировали и выравнивали с помощью GTDB-Tk версии 1.3.0 (Parks et al., 2018), а затем полученное выравнивание обрабатывали программой Gblocks версии 0.91b (Castresana, 2000). Для филогенетического анализа штаммов 3819-GS1 и 75b-Ac использовали GTDB-Tk 2.4.1 (Chaumeil et al., 2022), а для корректировки выравнивания использовали trimAL v.1.4.1 с опцией -automated1 (Capella-Gutiérrez et al., 2009). 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).

5.2.12 Анализ потерь и приобретения генов

Анализ приобретения и утраты генов, происходивших в процессе эволюции филогенетической группы, включающей штамм 3443-3Ac^T и его родственников, 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 ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 6. 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 Байкальской рифтовой зоны (Бурятия), а также из подземной биосферы Ессентукского месторождения минеральных вод. Упомянутые источники принципиально отличались друг от друга как по геохимическим, так и по физико-химическим параметрам (Таблица 1).

6.1 Ацетогенные бактерии горячих источников кальдеры Узон (Камчатка)

Курило-Камчатский регион расположен в зоне активной субдукции Тихоокеанской плиты, что обуславливает повышенную вулканическую и сейсмическую активность на этой территории. Горячие источники региона имеют вулканическое происхождение, то есть, нагрев гидротермальных флюидов происходит за счет прямого контакта с магмой или сильно разогретыми породами. Наиболее яркие проявления геотермальной активности наблюдаются в кальдере вулкана Узон. Горячие источники Узона богаты различными восстановленными соединениями и вулканическими газами, среди которых преобладают CO_2 , N_2 , H_2 , CH_4 , H_2S , CO и NH_3 . Исследования микробных сообществ этих источников активно ведутся уже на протяжении десятилетий (Бонч-Осмоловская, 2004; Kochetkova et al., 2023). Однако в связи с тем, что ацетогенные бактерии в источниках Камчатки являются минорным компонентом сообщества, практически не детектируемым методами молекулярной экологии, целевое изучение этой физиологической группы в источниках Узона до сих пор не проводилось.

Таблица 1 – Основные характеристики природных образцов, использованных для получения накопительных культур микроорганизмов, способных к хемолитоавтотрофному ацетогенезу. ND, не определено.

Группа местообитаний	Образец	Название источника	Координаты источника	Описание образца	Температура, °C	pH	ОВП, мВ
Камчатка	3805	Углубление в ручье	54° 26' 9.61" N 160° 08' 16.65" E	Розово-белые осадки	60	8,5	ND
	3815	Солнечный	54° 29' 33.79" N 159° 59' 18.98" E	Черные и оранжевые осадки	42	6,2	+ 15
	3816	Термофильный ручей	54° 29' 35.14" N 160° 00' 25.1" E	Белые микробные нити и серый осадок под ними	58	6,0	–285
	3819	Нефтяная площадка	54° 30' 0.84" N 160° 00' 3.27" E	Термально нагретая почва	74	3,1	–108
	3823	Псевдогендальф	54° 29' 31.81" N 160° 00' 30.16" E	Глинистые черные осадки и серые обрастания	78	6,5	–278
	3824	Исток ручья рядом с источником Трещинным	54° 29' 32.51" N 160° 00' 30.36" E	Белые сетчатые микробные маты и темно-зеленый осадок	53	5,4	–290
	3825	Источник рядом с Нефтяной площадкой	54° 30' 1.6" N 160° 00' 16.07" E	Черные глинистые осадки, микробные обрастания и лиственной опад	82	5,3	–239
	3827	Источник рядом с Нефтяной площадкой	54° 30' 0.35" N 160° 00' 3.95" E	Черные глинистые осадки, серые микробные обрастания и лиственной опад	78	6,0	–295
	3827/2	Источник рядом с Нефтяной площадкой	54° 30' 1.6" N 160° 00' 16.07" E	Желтый микробный мат	32	ND	ND
	3831	Банное озеро	54° 29' 58.38" N 160° 00' 50.94" E	Серый осадок	40	6,0	–60

Таблица 1 – Продолжение

Группа местообитаний	Образец	Название источника	Координаты источника	Описание образца	Температура, °C	pH	ОВП, мВ
Ессентукское месторождение минеральных вод	75-бис	Скважина 75-бис	44° 02' 33" N 42° 48' 10" E	Фильтр, через который было пропущено 100 л воды из скважины	58	5,5	ND
Байкальская рифтовая зона	4703	Умхей; небольшой источник глубиной 2-5 см	54° 59' 15" N 111° 7' 5.8" E	Жирный микробный мат с бело-зеленым налетом, черный ил под матом	32	7,6	–238
	4704	Умхей; ручей глубиной 40-50 см	54° 59' 16.3" N 111° 7' 6.5" E	Черный осадок	42	9,5	–330
	4709	Гарга; источник за старой баней, переходящий в ручей.	54° 19' 12.79" N 110° 59' 38.32" E	Черные обрастания на древесине в источнике	74	7,8	–190
	4721	Уро; небольшой источник в центральной части термального поля	53° 26' 41.76" N 110° 07' 05.92" E	Слизистый белый слой под розовым микробным матом	50	9,0	–80
	4724	Уро; неглубокий ручей в западной части термального поля	53° 26' 42.22" N 110° 07' 05.89" E	Белый плотный желеобразный мат у выхода ручья	58	9,0	+10
	4725	Уро; небольшой источник в центральной части термального поля	53° 26' 41.76" N 110° 07' 05.92" E	Серый осадок под розовым микробным матом	59	8,8	–50
	4730	Гусиха	53° 24' 54.0" N 109° 21' 17.0" E	Серый песчаный осадок	51	9,1	–115
	4735	Горячинск; ручей	52° 59' 13.88" N 108° 18' 27.38" E	Черный осадок у подножия камня на берегу ручья	48	7,9	–160
	4736	Бухта Змеиная; ручей	53° 45' 59.02" N 109° 01' 38.47" E	Черный осадок под цианобактериальным матом	41	9,3	–350

Для получения накопительных культур хемолитоавтотрофных термофильных ацетогенов были использованы 10 образцов, отобранных в кальдере Узон и Долине гейзеров (Камчатка). Температурный диапазон источников составлял 32–82 °С, а значения pH варьировали от 3,1 до 8,5. Все пробы отбирали как смесь воды и осадка в соотношении 1:1. Более подробные характеристики мест отбора приведены в Таблице 1. Устойчивые накопительные культуры удалось получить после трех последовательных пересевов в присутствии H_2/CO_2 , pH 6,0 для 6 проб: 3815, 3816, 3827/2, 3831 (температура инкубации 50 °С) и 3819 (температура инкубации 70 °С). Состав микробных сообществ природных образцов и полученных накопительных культур представлен на Рисунке 4.

Источник Солнечный, расположенный на дне мелкого озера, представлял собой воронку диаметром около 1 м с активным выделением CO_2 . Дно источника было покрыто слоем красно-оранжевых железосодержащих отложений, под которыми были расположены серые и черные осадки. В зависимости от точки измерения температура и pH варьировались в пределах 40–64 °С и 6,0–6,8 соответственно. Эти параметры оставались относительно стабильными в течение нескольких лет наблюдений. Значение ОВП было отрицательным внутри осадка и близким к нулю на поверхности воды, где на него оказывают влияние атмосферные осадки. Проба 3815 была отобрана на краю источника, где температура составляла 42 °С, pH 6,2 и ОВП +15 мВ. Микробное сообщество источника Солнечный (проба 3815) характеризовалось наибольшим таксономическим разнообразием среди всех исследованных образцов (Рисунок 4). Наиболее многочисленными в сообществе были бактерии из филума *Pseudomonadota* (52,3% всех прокариот), относившиеся к родам *Aeromonas* (19,1%), *Methylothermus* (6,5%), *Thiobacter* (5,4%), а также к группе с неопределенным таксономическим положением в семействе *Hydrogenophilaceae* (7,7%). Вторым по численности компонентом сообщества были некультивируемые бактерии, относящиеся к филуму '*Bipolaricaulota*' (11,7%, ранее '*Candidatus Acetothermia*' и OP1). Также в сообществе присутствовали представители филума *Nitrospirota* (6,8%), большая часть которых относилась к родам *Nitrospira* (3,9%) и *Thermodesulfovibrio* (2,6%), и филума *Chloroflexota* (5,1%),

относившиеся к некультивируемым родам. Менее представленными в микробном сообществе пробы 3815 были филумы *Acidobacteriota* (3,8%), *Bacillota* (1,7%), RCP2-54 (1,6%), *Verrucomicrobiota* (1,3%), *Aquificota* (1,1%), '*Kapabacteria*' (1,1%), '*Kryptonita*' (1,1%) и *Planctomycetota* (1,0%). Доля архей в сообществе была незначительной и составляла менее 1%. Анализ состава микробного сообщества накопительной культуры 3815_Enrich, полученной из пробы источника Солнечный, показал, что наиболее представленными группами были метаногенные археи рода *Methanothermobacter* (36,0%), гидрогенотрофные сульфатредуцирующие бактерии рода *Thermodesulfobium* (34,9%) и хемоорганотрофные бактерии рода *Caloramator* (11,0%). Также в накопительной культуре в качестве минорного компонента присутствовали бактерии с неопределенным таксономическим положением в семействе *Thermoanaerobacteraceae* (2,3%), в котором лишь для одного из представителей, *T. kivui*, показана способность к ацетогенезу. В газовой фазе накопительной культуры 3815_Enrich было детектировано образование CH₄, что коррелировало с накоплением значительных количеств метаногенных архей в сообществе.

Горячий источник Термофильный представлял собой вытянутый ручей, в начале которого была расположена воронка шириной 5 м, из которой происходило активное выделение газа. На дне источника находились белые и серые осадки, а периметр ручья был покрыт белыми микробными обрастаниями. Образцы осадка были отобраны у края источника, где температура составляла 58 °С, pH 6,0 и ОВП –285 мВ. В микробном сообществе источника (проба 3816) доминировали бактерии, тогда как архей было менее 1% от общей численности (Рисунок 4). Наиболее многочисленными были представители бактериального филума *Aquificota* (52,8% всех прокариот), относившиеся к роду *Sulfurihydrogenibium* (52,7%). Представители этого рода известны образованием белых обрастаний в источниках с pH>5 и температурой 60–97 °С (Kochetkova et al., 2022). Среди других компонентов сообщества были обнаружены бактерии из филума *Chloroflexota* (9,8%), представленные некультивируемыми представителями семейства *Anaerolineaceae* (3,7%) и порядка *Aggregatilineales* (3,4%). К менее

многочисленным компонентам микробного сообщества относились представители филума *Thermodesulfobacteriota* (6,1%), в том числе бактерии рода *Desulfomonile* (1,1%), представители филума *Pseudomonadota* (6%), включающие бактерий рода *Thiofaba* (4,0%), а также некультивируемые представители семейства *Rhodocyclaceae* (1,7%). Среди минорных компонентов сообщества пробы 3816 присутствовали представители филумов TA06 (2,4%), *Acidobacteriota* (2,1%), *Deinococcota* (1,6%), *Verrucomicrobiota* (1,4%) и *Calditrichota* (1,1%), тогда как остальные филумы составляли менее 1% от общей численности. Микробное сообщество накопительной культуры 3816_Enrich, полученной из пробы ручья Термофильного, содержало большое количество представителей метаногенных архей рода *Methanothermobacter* (45,9%) и сульфатредуцирующих бактерий рода *Thermodesulfomicrobium* (42,6%). Другими детектированными группами микроорганизмов были представители родов термофильных бактерий *Pseudothermotoga* (3,3%), *Caloramator* (2,2%), *Thermanaerovibrio* (1,9%) и *Calditerrivibrio* (1,2%). Представители рода *Neomoorella*, на данный момент содержащего лишь способные к ацетогенезу виды, присутствовали в накопительной культуре в виде минорного компонента (0,6%). В газовой фазе накопительной культуры 3816_Enrich было детектировано образование CH₄, что свидетельствовало о протекании активного метаногенеза в этой накопительной культуре, так же как и в 3815_Enrich.

Нефтяная площадка – это участок геотермально прогретой почвы Восточного термального поля кальдеры Узон, имеющий размер примерно 10 × 5 м. В нем происходит просачивание молодой нефти на поверхность земли. Проба 3819 была отобрана со дна ямы глубиной 30 см, вырытой вручную на территории Нефтяной площадки. Яма быстро заполнялась водой, впоследствии образовавшей на своей поверхности нефтяную пленку. На момент отбора пробы температура воды составляла 74 °С, pH 3,1, а ОВП был –108 мВ. В микробном сообществе термально-нагретых почв Нефтяной площадки доминировали бактерии из филума *Pseudomonadota* (33,1%), представленного в основном родом *Acidithiobacillus* (32,3%), и филума *Campylobacterota* (22,0%), представленного родом *Desulfurella*

(22,0%). Обнаруженные в сообществе археи являлись представителями порядка *Marsarchaeales* (3,3%) и рода *Fervidicoccus* (2,4%) из филума *Thermoproteota* (6,1%), а также представителями группы A10 (3,1%) из филума *Thermoplasmatota* (3,2%). Остальные обнаруженные в сообществе последовательности относились к последовательностям 16S рРНК хлоропластов (31,7%), которые, вероятно, попали в пробу из растительности, окружавшей место отбора. В микробном сообществе накопительной культуры 3819_Enrich было обнаружено значительное накопление бактерий с неопределенным таксономическим положением в семействе *Neomoorellaceae* (73,6%), а остальная часть сообщества была представлена бактериями рода *Desulfothermobacter* (23,8%). В данной накопительной культуре было детектировано образование ацетата, что свидетельствовало об активном протекании процесса ацетогенеза. В ходе дальнейшей работы с накопительной культурой 3819_Enrich была получена чистая культура хемолитоавтотрофной ацетогенной бактерии штамм 3819-GS1, описание которой представлено в Главе 8.

Горячий источник, из которого была получена проба 3827/2, представлял собой группу воронкообразных выходов с умеренной эмиссией газа. Он был расположен в 15 м от Нефтяной площадки и окружен густой растительностью. Дно самой большой воронки было покрыто серыми микробными обрастаниями, под которыми располагались черные осадки. Температура внутри осадков достигала 78 °С, а значение рН 6,0. Микробное сообщество горячего источника состояло в основном из бактерий филума *Aquificota* (90,8%), относившихся в основном к роду *Sulfurihydrogenibium* (90,6%). Остальная часть сообщества включала в себя представителей рода *Caldimicrobium* (4,6%) из филума *Thermodesulfobacteriota* (4,6%) и представителей нескольких родов из филума *Pseudomonadota* (2,1%). Проба 3827/2 была отобрана из плотного микробного мата желтого цвета, расположенного вблизи описанного воронкообразного горячего источника. Учитывая плотную структуру мата, точные значения ОВП и рН не могли быть определены, а температура внутри мата была ниже, чем в основном горячем источнике, поскольку мат был в большей степени подвержен воздействию изменяющихся условий окружающей среды. Анализ состава микробного

сообщества накопительной культуры 3827_Enrich, которая была получена из пробы описанного микробного мата, выявил образование бинарной культуры, состоявшей в основном из бактерий неопределенного таксономического положения в семействе *Thermanaerobacteraceae* (92,8%) с небольшой долей представителей рода *Thermodesulfobium* (6,8%).

Озеро Банное представляло собой крупное озеро с серыми и черными осадками, а также с многочисленными участками выхода радона. Проба 3831 была отобрана из осадков озера. Микробное сообщество озера Банного состояло в основном из бактерий, участвующих в цикле серы. Среди них были представители филума *Pseudomonadota* (41,6%), относившиеся преимущественно к роду *Thiomonas* (41,0%), а также представители филумов *Thermotogota* (13,5%) и *Campylobacterota* (12,1%), относившиеся к родам *Athalassotoga* (13,5%) и *Desulfurella* (12,1%) соответственно (Рисунок 4). В микробном сообществе также присутствовала большая доля архей, относящихся к группам A10 (20,3%) и BSLdp215 (4,9%) из филума *Thermoplasmatota* (25,2%). В накопительной культуре 3831_Enrich, полученной из пробы озера Банного, наблюдалось образование бинарной культуры, идентичной накопительной культуре 3827_Enrich, с большей частью, представленной неописанными бактериями семейства *Thermanaerobacteraceae* (94,1%), и минорным компонентом, представленным бактериями рода *Thermodesulfobium* (5,5%). Дальнейшее сравнение последовательностей участка V4 гена 16S рРНК представителей семейства *Thermanaerobacteraceae*, накопленных в культурах 3827_Enrich и 3831_Enrich, показало 100% сходства с участком V4 гена 16S рРНК облигатно хемолитоавтотрофного штамма 3443-3Ac^T, выделенного ранее из пробы ручья Каскадного кальдеры Узон. Описание штамма 3443-3Ac^T представлено в главе 7.

Таким образом, благодаря использованию селективных сред, обеспечивающих оптимальные условия для развития литоавтотрофных ацетогенов, из 10 образцов горячих источников, отобранных в кальдере Узон, удалось получить 5 устойчивых накопительных культур, среди которых 3 содержали значительное количество микроорганизмов, осуществлявших хемолитоавтотрофный ацетогенез.

6.2 Ацетогенные бактерии подземной биосферы Ессентукского месторождения минеральных вод

Регион Кавказских Минеральных Вод (КМВ) находится в пределах альпийской складчатой области Средиземноморского пояса. Для территории КМВ характерны геодинамическая нестабильность и повышенная сейсмичность, а также присутствуют следы недавней вулканической активности. Глубинная геодинамика питает восходящие термометаморфические флюиды, которые по разломам формируют разнообразные месторождения минеральных вод. Одним из них является Ессентукское месторождение минеральных вод (ЕММВ), чья территория составляет около 200 км² (Filimonova et al., 2020). В данном исследовании использовалась проба воды, отобранная из скважины 75-бис ЕММВ.

Скважина 75-бис достигает титон-валанжинского водоносного горизонта на глубине 974 м (Zavarzina et al., 2025). По своему химическому составу воды скважины хлоридно-гидрокарбонатные натриево-кальциевые (иногда с сульфатами), среднеминерализованные (4,1 г/л). Среди анионов доминирует HCO_3^- (3,812 г/л), а SO_4^{2-} и Cl^- присутствуют в количествах 0,829 и 0,691 г/л соответственно. Измеренные на выходе скважины значения температуры и pH составляют 20 °C и 6,3, однако данные, полученные при помощи кремниевых геотермометров и термодинамических расчетов указывают на более высокотемпературные и кислотные условия в самом водоносном горизонте, которые составляют 58 °C и pH 5,5. Газовый фактор (отношение объема добытого скважиной газа к объему добытой воды, м³/м³) в скважине 75-бис равен 16,3, причем концентрация CO₂ в газовой фазе составляет 99,44 %. Таким образом, воды скважины 75-бис являются термальными, анаэробными, минерализованными и высоконасыщенными газом (Zavarzina et al., 2025). 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.



Рисунок 4 – 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 $\leq 5\%$ от всех прокариот хотя бы в одном образце.

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 4). Более 90% микробного 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-Ас. Описание нового изолята представлено в Главе 7.

6.3 Ацетогенные бактерии горячих источников Байкальской рифтовой зоны

Байкальская рифтовая зона (БРЗ) – это крупный континентальный тектонический разлом, расположенный в Азии, с протяженностью около 2500 км от северо-западной Монголии через Восточно-Сибирские горы до Алданского щита. Центральный сегмент БРЗ представлен котловиной озера Байкал, которая является одновременно самой крупной и наиболее древней частью системы, занимая примерно треть всей рифтовой зоны. Сочетание таких сложных геологических особенностей, как современная тектоническая и сейсмическая активность, а также наличие глубинных разломов, которые пронизывают фундамент из гранитов и гнейсов протерозойского возраста, делая их проницаемыми для метеорных вод, обуславливает присутствие в пределах БРЗ многочисленных источников, различающихся по физическим, химическим и газовым свойствам. Для источников БРЗ характерны низкая минерализация (обычно не более 1 г/л), нейтральная или щелочная реакция среды, широкий диапазон температур и насыщенность N_2 . Считается, что формирование термальных источников БРЗ произошло в результате инфильтрации холодных метеорных вод по трещинам и разломам, которые при взаимодействии с вмещающими породами изменяют свой катионный, анионный и газовый состав.

В исследовании были использованы пробы, отобранные из горячих источников Баргузинской долины (Умхей, Гарга, Уро, Гусиха), Горячинска и Змеиной бухты. Для всех источников были характерными повышенные значения pH (7,6–9,5), а температуры значительно различались (32–74 °C). Основные характеристики проб и источников представлены в Таблице 1.

Анализ микробных сообществ двух горячих источников термального поля Умхей (№ 4703 и № 4704), показал преобладание представителей филумов *Chloroflexota* (23,4% и 26,3% всех прокариот), *Pseudomonadota* (45,6% и 11,2%) и *Nitrospirota* (7,0% и 23,9%). Менее многочисленными филумами в источниках № 4703 и № 4704 являлись филумы *Cyanobacteriota* (4,5% и 8,9%), *Desulfobacterota* (4,2% и 5,1%), *Acidobacteriota* (1,7% и 4,3%) и *Bacteroidota* (7,7% и 4,2%). В сообществе пробы № 4704 также были идентифицированы представители филума '*Bipolaricaulota*' (2,0%). Минорным компонентом сообщества источника № 4704 являлись также археи, которые составляли всего 1,7%.

Из горячего источника Гарга, содержавшего обломки старого деревянного сооружения, была отобрана проба № 4709, которая представляла собой черные микробные обрастания на древесине. Анализ микробного сообщества данных микробных обрастаний показал, что доминирующим компонентом сообщества являлись некультивируемые представители группы HR10 в филуме *Acidobacteriota*, которые составляли 43,2% всех прокариот. Следующими по численности являлись бактерии из филумов *Deinococcota* (19,5%), *Armatimonadota* (11,0%) и *Bacteroidota* (9,1%). В меньших количествах в сообществе присутствовали представители филумов *Chloroflexota* (4,0%), *Pseudomonadota* (3,1%), *Aquificota* (2,5%), CSP1-3 (2,1%), *Patescibacteria* (1,6%) и DRYD01 (1,3%).

На термальном поле Уро отмечалось большое количество разнообразных микробных фототрофных матов. Проба № 4721 была отобрана из белого слизистого слоя, расположенного между фототрофным матом и серыми осадками. Микробное сообщество этого слоя преимущественно было представлено филумами *Chloroflexota* (31,1%) и *Pseudomonadota* (28,7%). Среди других групп с высокой степенью представленности были бактерии из филумов *Cyanobacteriota* (16,1%) и

Bacteroidota (7,1%). Минорная часть сообщества была представлена бактериями из филумов *Deinococcota* (1,8%), *Armatimonadota* (1,7%), CSP1-3 (1,2%) и *Planctomycetota* (1,1%). Под фототрофными матами и промежуточным белым слоем располагались серые осадки (№ 4725), в микробном сообществе которых доминировали некультивируемые представители филума *Chloroflexota* (34,5%). Среди других групп с высокой степенью представленности в сообществе были бактерии из филумов *Nitrospirota* (11,4%), *Bacillota* (10,7%), *Acidobacteriota* (7,1%), *Pseudomonadota* (7,1%), CSP1-3 (4,9%), *Desulfobacterota* (4,6%), *Actinomycetota* (3,8%), '*Bipolaricaulota*' (3,1%), *Bacteroidota* (2,2%) и *Armatimonadota* (1,2%). На термальном поле Уро также был исследован плотный белый микробный мат, из которого была отобрана проба №4721. Доминирующим компонентом микробного мата являлись представители филума *Armatimonadota* (61,0%), в то время как остальная часть сообщества была представлена бактериями филума *Chloroflexota* (20,0%), *Acidobacteriota* (5,3%), *Pseudomonadota* (4,4%), *Deinococcota* (4,0%) и *Bacteroidota* (3,0%).

Микробное сообщество горячего источника термального поля Гусиха (№ 4730) было представлено филумами *Chloroflexota* (26,8%), *Acidobacteriota* (19,9%), *Nitrospirota* (12,1%) и *Desulfobacterota* (9,1%), в то время как в микробном сообществе черных илов вблизи скважины в Горячинске (№ 4735) были идентифицированы бактерии, относящиеся к *Pseudomonadota* (27,9%), *Bacteroidota* (15,6%) и *Chloroflexota* (14,9%), *Deinococcota* (7,2%), *Desulfobacterota* (7,0%), *Acidobacteriota* (4,9%), *Nitrospirota* (4,8%), *Cyanobacteriota* (4,1%), *Actinomycetota* (3,4%), *Bacillota* (2,3%), *Verrucomicrobiota* (1,6%) и *Planctomycetota* (1,2%).

Горячий источник бухты Змеиной (№ 4736) отличался от других источников БРЗ пониженной температурой (32–42°C), а также повышенной интенсивностью антропогенного воздействия. Микробное сообщество было в основном представлено бактериями из филумов *Cyanobacteriota* (36,1%) и *Chloroflexota* (28,1%), *Nitrospirota* (13,2%) и *Pseudomonadota* (11,7%). Минорными компонентами сообщества были представители филумов *Desulfobacterota* (3,2%) и *Bacteroidota* (2,4%).

Анализ состава микробных сообществ термальных источников БРЗ не выявил представителей бактериальных групп, для которых показана способность к ацетогенезу. Для более глубокого изучения присутствия в источниках представителей исследуемой физиологической группы были поставлены накопительные культуры на среде с низкой минерализацией с H_2 в качестве донора электронов и CO_2 в качестве акцептора и источника углерода, pH 8,0. Культивирование осуществляли при температурах 42–72 °C. Спустя 4 последовательных пересева, была получена единственная устойчивая накопительная культура из пробы 4704. Однако анализ состава микробного сообщества показал, что в данных условиях произошло накопление различных групп бактерий, а именно сульфатредукторов из рода *Thermodesulfovibrio* (53,3%), хемоорганотрофов из рода *Pseudomonas* (15,5%), а также многочисленных представителей филумов *Actinomycetota* (11,5%) и *Bacillota* (5,9%). В накопительной культуре присутствовали и археи, которые были представлены метаногенами из рода *Methanobacterium* (13,2%). Таким образом, в ходе исследования щелочных горячих источников БРЗ не удалось выделить хемолитоавтотрофных ацетогенных бактерий, что может быть связано с особым газовым составом горячих источников этого региона, где основным компонентом является N_2 , в то время как концентрации CO_2 понижены (Zipra et al., 2025).

ГЛАВА 7. ОПИСАНИЕ НОВОЙ АЦЕТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ *ACETICELLA AUTOTROPHICA* GEN. NOV., SP. NOV.

Из пробы осадков, отобранной в наземном термальном ручье Каскадный (N54° 30.026' E160° 00.374', 658 м) Восточного термального поля кальдеры вулкана Узон (полуостров Камчатка, Россия), была выделена чистая культура ацетогенной бактерии штамм 3443-3Ac^T (= DSM 108286^T). Выделение чистой культуры осуществляли на восстановленной сульфидом среде с использованием H₂ в качестве донора электронов и HCO₃⁻/CO₂ – в качестве источника углерода и акцептора электронов. Значение pH среды составляло 6,0, а температура инкубации 55 °C.

7.1 Штамм 3443-3Ac^T

7.1.1 Морфология штамма 3443-3Ac^T

Клетки штамма 3443-3Ac^T имели палочковидную форму, диаметр 0,5–0,7 мкм и длину 1,5–5 мкм. В зависимости от фазы роста и условий культивирования они располагались одиночно, парами или в цепочках. Подвижности не наблюдалось, а при исследовании негативно окрашенных препаратов (Рисунок 5А) жгутики выявлены не были. Штамм 3443-3Ac^T формировал круглые терминальные эндоспores после продолжительного (10 суток) культивирования при 50 °C, однако доля клеток, образующих споры, не превышала 1–2%. Клетки окрашивались по Граму положительно, а ультратонкие срезы клеток (Рисунок 5Б) выявили наличие грамположительного типа клеточной стенки.

7.1.2 Характеристики роста штамма 3443-3Ac^T

Штамм 3443-3Ac^T являлся строго анаэробным микроорганизмом, рост которого наблюдался только в присутствии сульфида натрия в среде, необходимого для достижения низких значений ОВП (< –200 мВ). Рост штамма 3443-3Ac^T происходил в интервале температур от 30 до 60 °C с максимальными значениями скорости роста при 46–50 °C (Рисунок 6А). Увеличение продолжительности культивирования до 10 суток не приводило к появлению роста при 22 °C и ниже, а

также при 65 °С и выше. Диапазон pH для роста находился в пределах 4,5–7,3 с оптимумом при pH 6,0 (Рисунок 6Б). Рост не был показан при значениях pH 4,3 и ниже, а также при pH 7,5 и выше.

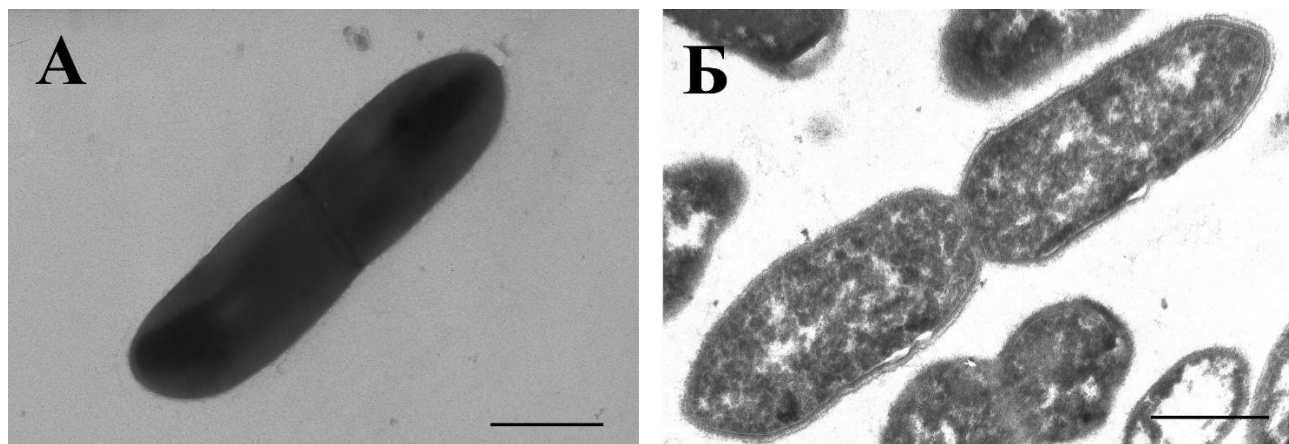


Рисунок 5 – Морфология и ультраструктура клеток *Aceticella autotrophica* 3443-3Ac^T: (А) электронная микроскопия, препараты целых клеток (окраска фосфовольфрамовой кислотой), масштаб – 0,5 мкм; (Б) электронная микроскопия, ультратонкие срезы (окраска уранилацетатом), масштаб – 0,5 мкм.

Культура росла при концентрациях NaCl до 1,5% (Рисунок 6В), 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 роста не было. Для проверки зависимости автотрофного роста штамма 3443-3Ac^T от присутствия ионов Na⁺ культивирование осуществляли в течение пяти последовательных пересевов на двух типах сред: на минимальной среде с предельно низким содержанием Na⁺ (остаточные концентрации менее 100 мкМ) и на среде, дополнительно обогащенной 70 мМ NaCl. Поскольку скорости роста во всех пересевах обоих вариантов оставались без существенных изменений, был сделан вывод об отсутствии зависимости роста культуры от наличия Na⁺ в среде. На Рисунке 6Г приведены данные по скорости роста и выходу биомассы, полученные в пятом пересеве. 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 50 °С, pH 6,0, без дополнительного внесения NaCl, с добавлением витаминов) составляло 4,5 часа.

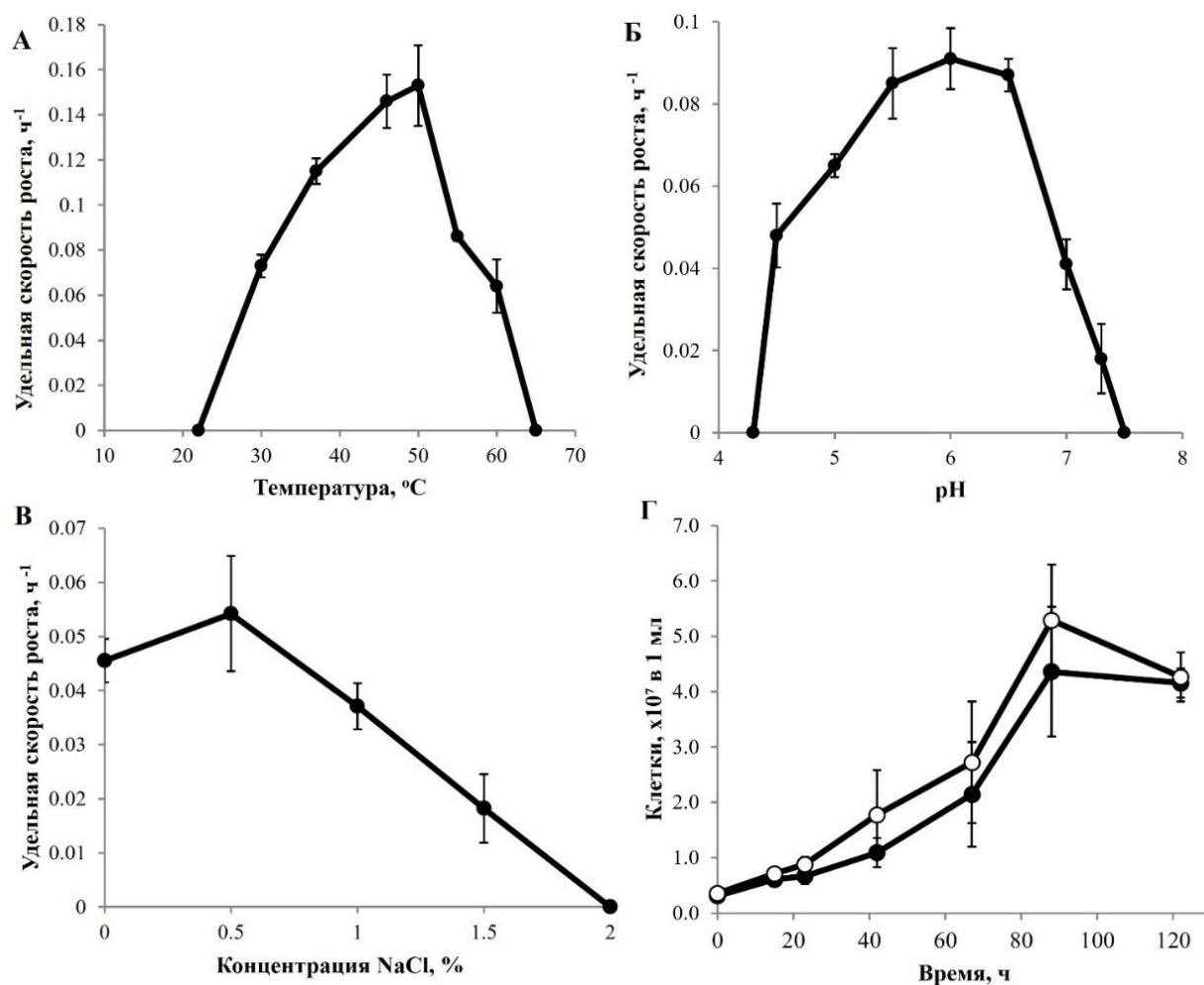


Рисунок 6 – Влияние температуры (А), pH (Б), NaCl (В) на рост штамма 3443-3Ac^T. (Г) Влияние Na⁺ на автотрофный рост штамма 3443-3Ac^T на среде, обогащенной Na⁺ (●) и не обогащенной Na⁺ (○). На графиках отражены результаты, полученные вычислением среднего значения из трех повторностей.

7.1.3 Метаболизм штамма 3443-3Ac^T

7.1.3.1 Доноры электронов, используемые штаммом 3443-3Ac^T

Штамм 3443-3Ac^T оптимально рос в хемолитоавтотрофных условиях в присутствии H₂ в качестве донора электронов и HCO₃⁻/CO₂ в качестве источника углерода и акцептора электронов (Рисунок 7А). 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 H₂. Скорость роста же не изменялась (Рисунок 7Б). При росте на формиате основными продуктами являлись ацетат и CO₂, при этом

детектировалось также образование незначительных количеств H_2 . Формиат преобразовывался в ацетат и CO_2 , причем 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.

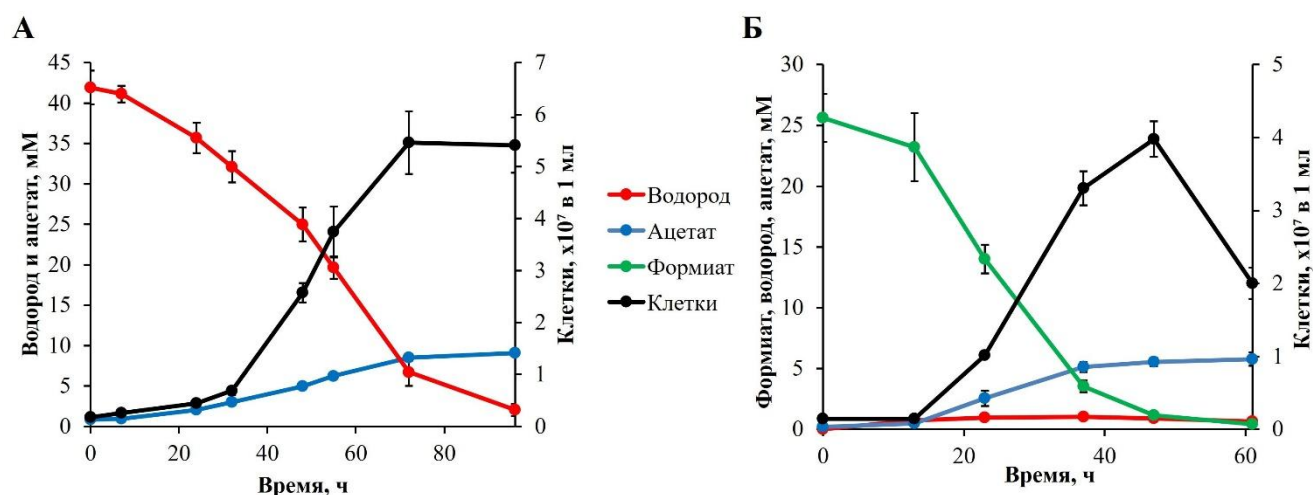


Рисунок 7 – Рост и образование ацетата штаммом 3443-3Ac^T при 50 °С и pH 6,0 (А) в присутствии H_2 и CO_2 и (Б) в присутствии формиата в среде. На графиках отражены результаты, полученные вычислением среднего значения из трех повторностей.

Адаптация к росту на СО проводилась по методике, описанной ранее для *T. kivui* (Weghoff and Müller, 2016) в присутствии и в отсутствии S^0 . Клетки, предварительно выращенные на H_2/CO_2 , переносили в среду, в газовой фазе которой содержался 1% СО (в присутствии 49% H_2 и 50% CO_2). Путем ступенчатого повышения концентрации СО (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% СО, 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% СО, 60% H_2 и 20% CO_2 . Основным продуктом метаболизма при росте на газовой смеси такого состава являлся ацетат. Удельная скорость роста в присутствии СО составляла $0,0063 \text{ ч}^{-1}$, а в отсутствии СО (контроль) – $0,0284 \text{ ч}^{-1}$,

что коррелировало с наличием продолжительной лаг-фазы в первом случае (Рисунок 8). Урожай клеток в присутствии CO также был значительно ниже контроля, и его максимальное значение составляло 2×10^7 клеток в 1 мл культуры.

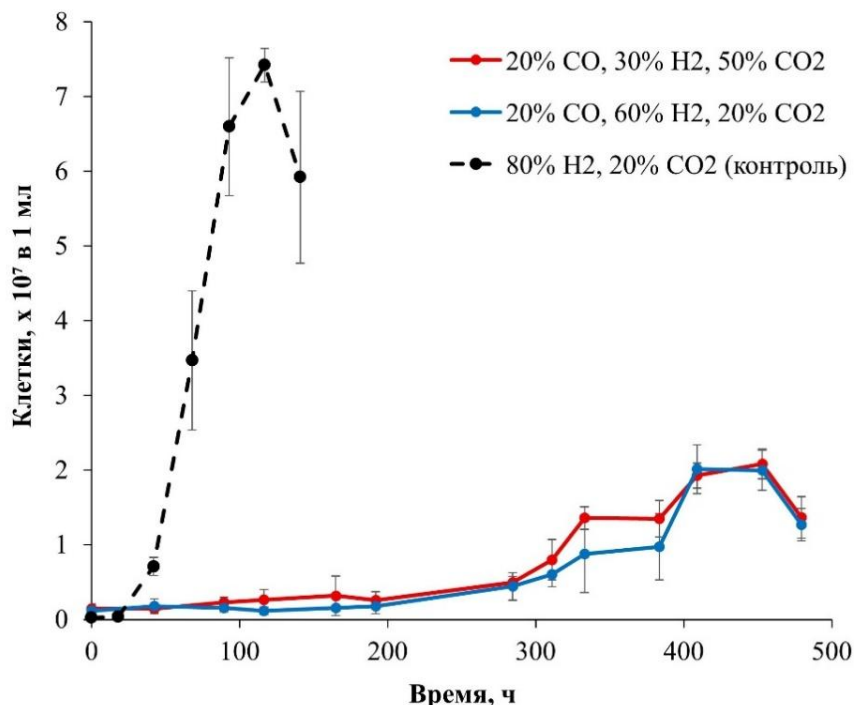


Рисунок 8 – Рост штамма 3443-3Ac^T на среде в присутствии элементарной серы и в атмосфере, содержащей 20% CO, при 50 °C и pH 6,0. На графиках отражены результаты, полученные вычислением среднего значения из трех повторностей.

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 и раффиноза (0,5, 2 и 5 г/л). Кроме того, культура не метаболизировала сахарные спирты (сорбит, маннит; 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, глицерин, метанол; 5, 20 и 40 мМ), а также ароматические соединения (2-метоксифенол, 3,4-диметоксибензоат, 2-метоксибензоат; 1, 5 и 10 мМ).

7.1.3.2 Акцепторы электронов, используемые штаммом 3443-3Ac^T

При культивировании в присутствии H₂ или формиата штамм 3443-3Ac^T не проявлял способности использовать в качестве акцепторов электронов нитрат, сульфат, тиосульфат, перхлорат, фумарат, цитрат Fe(III) (в концентрациях 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 H₂/CO₂ или формиата наблюдалось образование сульфида, при этом происходило снижение количества образуемого ацетата (Рисунок 9). В сравнении с контрольными условиями без добавления серы удельная скорость роста увеличивалась на 20%, а урожай клеток – почти на 80%.

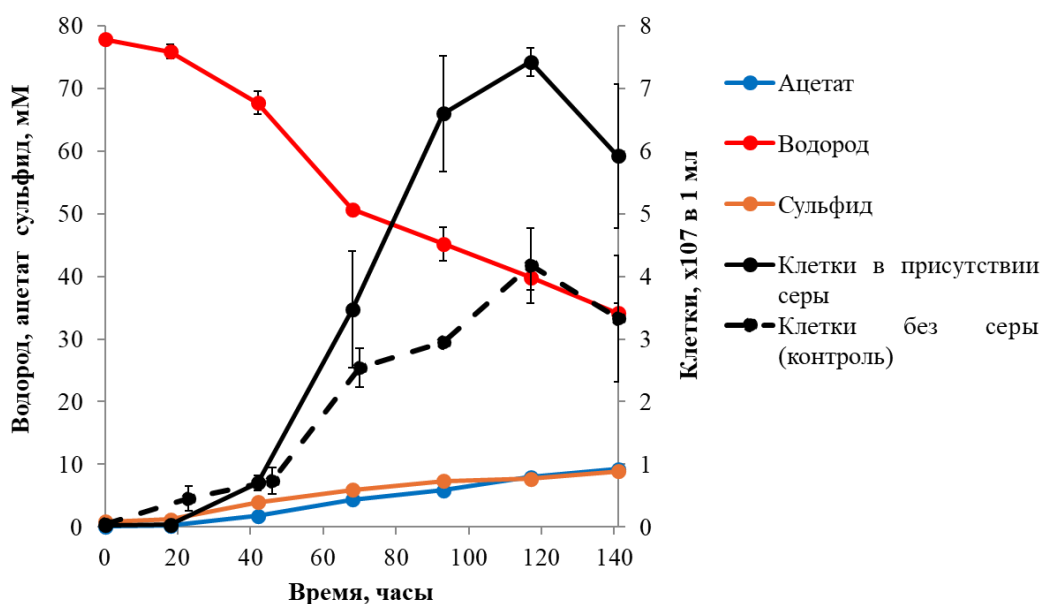


Рисунок 9 – Рост штамма 3443-3Ac^T в присутствии H₂/CO₂ и S⁰ в среде при 50 °C и pH 6,0. На графиках отражены результаты, полученные вычислением среднего значения из трех повторностей.

7.1.4 Отношение штамма 3443-3Ac^T к антибиотикам

Было показано, что штамм 3443-3Ac^T был чувствителен к канамицину, тетрациклину, ампициллину и хлорамфениколу, для которых минимальная ингибирующая концентрация (МИК) составляла 50 мкг/мл. Для эритромицина была показана МИК 100 мкг/мл.

7.1.5 Рост штамма 3443-3Ac^T на твердых средах

Для штамма 3443-3Ac^T была показана способность к образованию колоний на агарозе (2,5 %), но не на гелерите (1,5 %) и агаре (2,5 %). Оптимальным же оказался рост на агарозе. Образование наибольшего количества колоний наблюдалось на агарозе с 13 мл газовой фазы, содержащей H₂/CO₂ 1:1. В качестве инокулята использовалась культура штамма на стадии поздней экспоненты. Оптимальная температура роста колоний штамма 3443-3Ac^T совпадала с оптимальной температурой роста на жидкой среде и составляла 50 °C.

7.1.6 Хемотаксономическая характеристика штамма 3443-3Ac^T

Анализ состава жирных кислот штамма 3443-3Ac^T показал преобладание двух основных компонентов: изо-C15:0 (52,8%) и C16:0 (40,4%). Среди сопутствующих жирных кислот, присутствующих в значительно меньших количествах, были идентифицированы изо-C17:0 (4,8%), C18:0 (0,9%), изо-C16:0 (0,8%) и антеизо-C17:0 (0,4%). Анализ полярных липидов выявил спектр соединений, включающий 4 еще не охарактеризованных фосфолипида и один аминокислотсодержащий фосфолипид. Последний по своим физико-химическим свойствам (подвижности в системе растворителей) проявлял сходство с фосфатидилэтаноламином. Метод ТСХ-МС показал отсутствие у микроорганизма дыхательных хинонов.

7.1.7 Филогенетическая характеристика штамма 3443-3Ac^T

С помощью гибридного секвенирования на платформах Illumina HiSeq и Oxford Nanopore была определена полная геномная последовательность штамма 3443-3Ac^T, которую удалось собрать в одну кольцевую хромосому. Длина полученной хромосомной последовательности составляла 2,267,618 нуклеотидов. Доля Г+Ц *in silico* была равна 33,0 мол.%. В результате использования автоматических методов для предсказания генов и их аннотации было детектировано 2234 генов, среди которых 2093 являлись белок-кодирующими, 72 – РНК-кодирующими, 69 – псевдогенами.

Анализ генома штамма 3443-3Ac^T выявил наличие четырех копий гена 16S рРНК с высокой идентичностью последовательностей между собой (99,8–100%). Филогенетический анализ, основанный на поиске гомологичных последовательностей гена 16S рРНК в базе данных BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), позволил установить сходство 93–94% с гомологичными генами представителей рода *Thermoanaerobacterium* и 86–88% – представителей родов *Thermoanaerobacter* и *Caldanaerobacter*.

Согласно последнему изданию Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (BMSAB), род *Thermoanaerobacterium* относится к группе *Thermoanaerobacterales* Incertae Sedis Family III (включает в себя 9 родов) полифилитического порядка *Thermoanaerobacterales*, тогда как роды *Thermoanaerobacter* и *Caldanaerobacter* входят в состав семейства *Thermoanaerobacteraceae* (включает в себя 13 родов) порядка *Thermoanaerobacterales*. В то же время, согласно таксономии базы данных The Genome Taxonomy Database (GTDB; версия 07-RS207), основанной на выравнивании конкатенированных последовательностей белков набора bac120 и охватывающей сотни тысяч геномов (Parks et al., 2018, 2020), лишь три рода (*Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacter* и *Caldanaerobacter*) образуют семейство f_Thermoanaerobacteraceae в составе порядка o_Thermoanaerobacterales.

С целью уточнения таксономического положения штамма 3443-3Ac^T был проведен филогенетический анализ с использованием маркерных белков набора bac120. В анализ были включены исследуемый штамм 3443-3Ac^T, все представители порядка *Thermoanaerobacterales* (согласно BMSAB), чьи геномные последовательности доступны в базах данных, а также ряд микроорганизмов, относящихся к филуму p_Bacillota в системе GTDB. Построенное филогенетическое дерево (Рисунок 10) продемонстрировало, что штамм 3443-3Ac^T входит в состав монофилетической клады, объединяющей представителей родов *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacter*, *Caldanaerobacter*, *Calorimonas* и *Caldanaerobius*, и занимает в этой группе обособленную ветвь уровня рода.

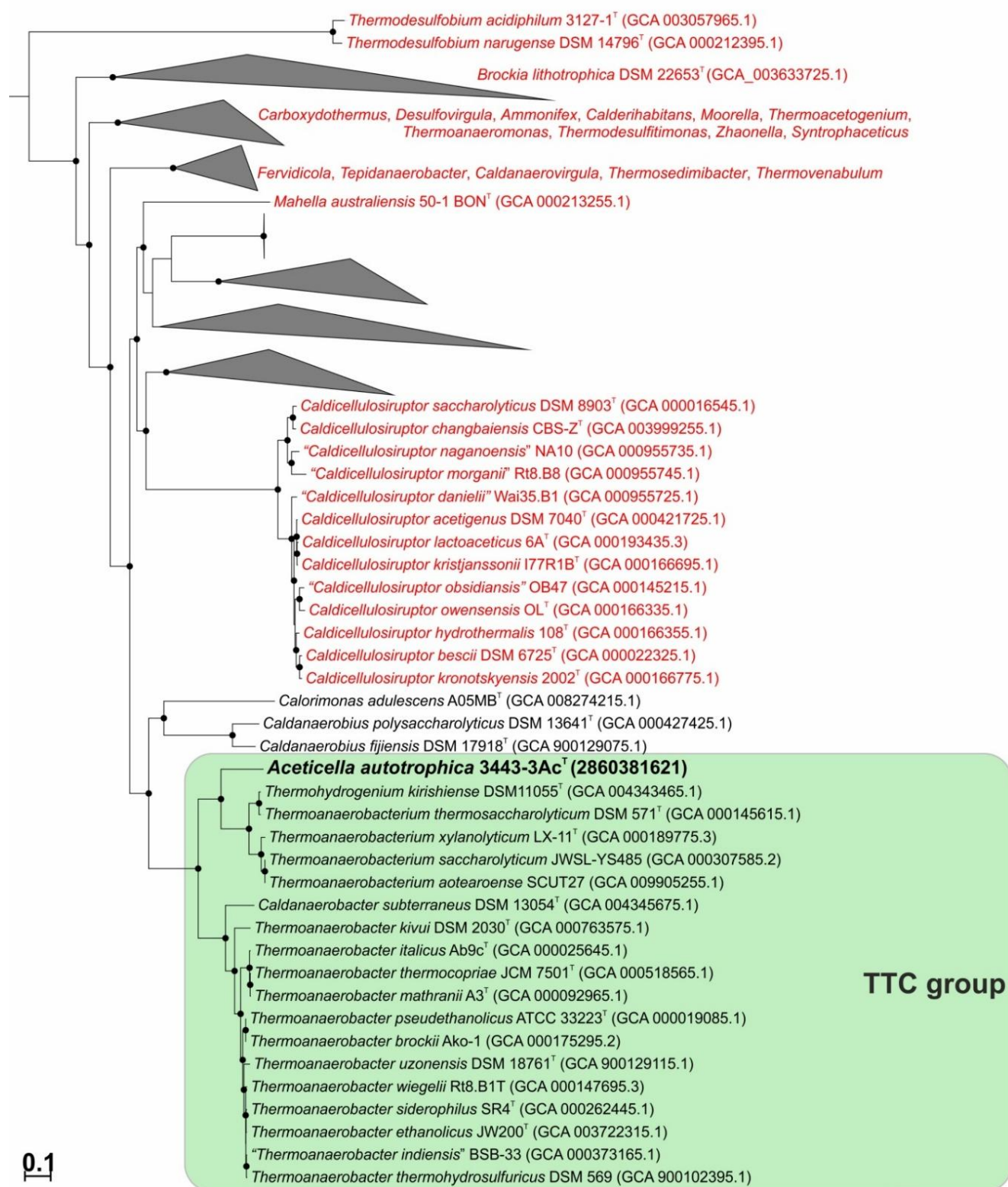


Рисунок 10 – Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия на основе набора консервативных белков *bac120*. Показано положение штамма 3443-3Ac^T (выделен жирным шрифтом) среди родственных таксонов. Виды *Thermoanaerobacteriales*, которые были ошибочно классифицированы и должны быть отнесены к другим группам, обозначены красным цветом. Узлы, отмеченные черными кружками, имеют значения бустрэн-поддержки выше 50%. В качестве внешней группы использован *Melioribacter roseus* P3M-2^T (на рисунке не показан).

Таблица 2 – Основные характеристики, отличающие род *Aceticella* gen. nov. от родов *Thermoanaerobacterium* (Yamamoto et al., 1998; Romano et al., 2011; Shang et al., 2013; Onyenwoke and Wiegel, 2015; Lopez et al., 2017), *Thermoanaerobacter* (Wagner et al., 2008; Tomas et al., 2013; Onyenwoke и Wiegel, 2015) и *Caldanaerobacter* (Kim et al., 2001; Kozina et al., 2010; Fardeau et al., 2015). Количество видов указано в скобках. +, положительный; –, отрицательный; V, признак варьирует у разных видов; ND, не определено.

Признак	<i>Aceticella</i> (1)	<i>Thermoanaerobacterium</i> (9)	<i>Thermoanaerobacter</i> (16)	<i>Caldanaerobacter</i> (2)
Источник выделения	Горячие источники	Геотермальные участки, горячие источники, консервированные продукты, образцы навоза	Геотермальные участки, гидротермальные выходы, горячие источники, вода и осадки термальных ванн, геотермально нагретые образцы нефти, почва, сахарные заводы, домашняя пыль, компост из верблюжьего навоза, испорченное мясо, термофильный биореактор, перерабатывающий твердые бытовые отходы завода по производству биогаза	Горячий источник, подводный гидротермальный выход, геотермальная вода, нефтяная скважина
Клеточная стенка	Грамположительное строение клеточной стенки и положительный результат окрашивания по Граму	Клеточная стенка имеет грамположительное строение, но результаты окрашивания по Граму различные	Клеточная стенка имеет грамположительное строение, но результаты окрашивания по Граму различные	Клеточная стенка имеет грамположительное строение, но результаты окрашивания по Граму различные
Подвижность	–	+	V	V
Образование спор	+	V	V	V

Таблица 2 – Продолжение.

Признак	<i>Aceticella</i> (1)	<i>Thermoanaerobacterium</i> (9)	<i>Thermoanaerobacter</i> (16)	<i>Caldanaerobacter</i> (2)
Морфология	Палочковидные клетки, встречаются поодиночке, в парах или цепочках в зависимости от фазы роста и условий культивирования	Палочковидные клетки, встречаются поодиночке, в парах или цепочках в зависимости от фазы роста и условий культивирования	Палочковидные клетки, встречаются поодиночке, в парах или цепочках в зависимости от фазы роста и условий культивирования.	Палочковидные клетки, встречаются поодиночке, в парах или цепочках в зависимости от фазы роста и условий культивирования. Иногда клетки ветвятся
Температура роста (°C)				
Диапазон	30–60	35–75	30–85	40–85
Оптимум	50	50–60	55–71	65–75
pH роста				
Диапазон pH роста	4,5–7,3	3,8 – 8,5	4,0–9,9	4,5–9,2
Оптимум pH роста	6,0	5,2 –7,8	5,8–8,5	6,5–7,5
NaCl для роста (%)				
Диапазон	0–1,5	0–3,0	0–4,5	0–4,0
Оптимум	0	0,1–2,5	0,5–1	0–2,5
Хемоорганогетеротрофный рост	–	+	+	+
Хемолитогетеротрофный рост	–	ND	V	V
Хемолитоавтотрофный рост	+	–	V*	–
Использование субстратов:				
Глюкоза	–	+	+	+
Фруктоза	–	V	+	+
Галактоза	–	V	V	+
Манноза	–	+	+	+
Ксилоза	–	+	V	V
Целлобиоза	–	+	V	+

Таблица 2 – Продолжение.

Признак	<i>Aceticella</i> (1)	<i>Thermoanaerobacterium</i> (9)	<i>Thermoanaerobacter</i> (16)	<i>Caldanaerobacter</i> (2)
Мальтоза	–	+	V	+
Сахароза	–	V	V	V
Пектин	–	V	V	nd
Крахмал	–	V	V	+
Ксилан	–	+	V	V
Целлюлоза	–	–	V	ND
Продукты брожения гексоз	NA	Этанол, ацетат, лактат, H ₂ и CO ₂ . Иногда наблюдается образование бутирата и бутанола	Этанол, ацетат, лактат, H ₂ и CO ₂ . Иногда наблюдается образование бутирата, изобутирата, пропионата и сукцината	Ацетат, H ₂ , CO ₂ , L- аланин, этанол и лактат. Иногда наблюдается образование пропионата, изобутирата и изовалерата
Гидролиз желатина	–	V	V	–
Акцепторы электронов:				
Сульфит	–	V	V	V
Сера	+	V	V	V
Тиосульфат	–	+	+	+
Нитрат	–	V	V	V
Способность к ацетогенезу	+	–	V**	–
Доля Г+Ц (мол.%)	33,0	29,0–36,1	30,0–38,0	33,0–41,0

* Хемолитоавтотрофный рост показан только для *Thermoanaerobacter kivui* (H₂ + CO₂ и CO + CO₂).

** Способность к ацетогенезу показана только для *Thermoanaerobacter kivui*.

Таким образом, на основании фенотипических (Таблица 2), генотипических и филогенетических 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.

7.1.8 Анализ генома штамма 3443-3Ac^T

7.1.8.1 Генетические детерминанты ацетогенеза при росте на H₂/CO₂

Анализ генома штамма 3443-3Ac^T выявил наличие полного набора генов, кодирующих белки, необходимые для хемолитоавтотрофного ацетогенного роста с использованием H₂ (Рисунок 11).

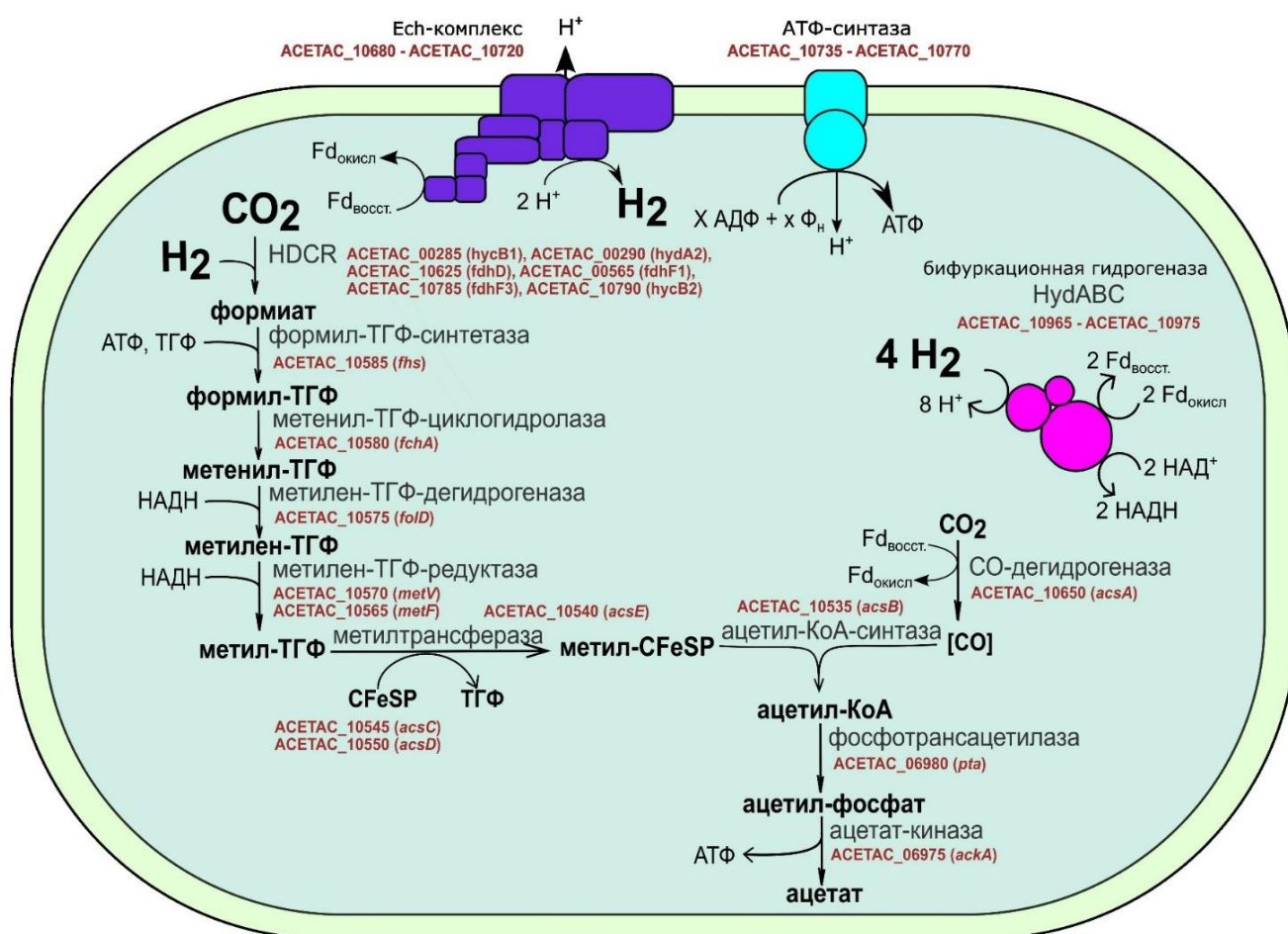


Рисунок 11 – Модель ацетогенеза штамма 3443-3Ac^T при росте на H₂ и CO₂.

Окислительный модуль ацетогенеза представлен бифуркационной [FeFe]-гидрогеназой HydABC, осуществляющей восстановление НАД⁺ и Fd_{окисл} в эквимольном соотношении при окислении H₂. Данный фермент

(ACETAC_10965–ACETAC_10975) проявляет высокую степень гомологии (47–58% сходства аминокислотных последовательностей субъединиц) с биохимически охарактеризованными бифуркационными гидрогеназами ацетогенных бактерий *A. woodii* и *N. thermoacetica* (Schuchmann and Müller, 2012; Wang et al., 2013). Еще большая степень гомологии (79–84% сходства) наблюдается с гидрогеназой HydABC *T. kivui*, свойства которой были предсказаны на основе гомологии с вышеупомянутыми биохимически охарактеризованными комплексами (Hess et al., 2014). Помимо HydABC и гидрогеназного компонента HydA2 (входит в состав HDCR, см. ниже), в геноме исследуемого штамма не обнаружено генов других гидрогеназ, вовлеченных в окисление H_2 . Что касается гидрогеназ, продуцирующих H_2 , обнаружены гены Ni-содержащей мембраносвязанной энергетической гидрогеназы, которая в ходе восстановления H^+ до H_2 генерирует трансмембранный электрохимический потенциал (см. ниже).

Полученные при окислении H_2 восстановительные эквиваленты (НАДН и $Fd_{\text{восст}}$) участвуют в работе восстановительного модуля. Восстановительный модуль представлен ПВЛ, первым этапом метильной ветви которого является восстановление CO_2 до формиата. У штамма 3443-3Ac^T данную реакцию катализирует HDCR. Гены, предположительно кодирующие компоненты этого комплекса у исследуемого штамма, не организованы в единый кластер, в то время как у *A. woodii* и *T. kivui* все 4 гена локализованы в составе единого кластера, который также содержит ген *fdhD*, предположительно осуществляющий регуляторную функцию. В ходе анализа у штамма 3443-3Ac^T были выявлены три гена формиатдегидрогеназы. Ген *fdhF1* (ACETAC_00565) кодирует селен-независимую формиатдегидрогеназу; *fdhF2* (ACETAC_08370/ACETAC_08380) и *fdhF3* (ACETAC_10785) кодируют селенсодержащие формиатдегидрогеназы, причем первый из них инактивирован в результате встраивания транспозонной последовательности, а второй характеризуется высокой степенью идентичности (76–77%) с соответствующей последовательностью *T. kivui*. В непосредственном окружении гена *fdhF3* обнаружен ген *hucB2* (ACETAC_10790), кодирующий белок с предполагаемой электротранспортной функцией. Отдельно в геноме

локализованы гены, кодирующие компоненты гидрогеназной части HDCR: *hydA2* (ACETAC_00290) и *hucB1* (ACETAC_00285). Кроме того, у исследуемого штамма присутствует ген *fdhD* (ACETAC_10625), характерный для генных кластеров, кодирующих HDCR у вышеупомянутых модельных бактерий, и предположительно несущий вспомогательную функцию.

Гены, кодирующие остальные ферменты ПВЛ (за исключением *acsA*), у штамма 3443-3Ac^T организованы в единый кластер, и включают в себя гены 10-формил-ТГФ синтетазы (*fhs*, ACETAC_10585), метенил-ТГФ-циклогидролазы (*fchA*, ACETAC_10580), метил-ТГФ дегидрогеназы (*folD*, ACETAC_10575), метилен-ТГФ-редуктазы (*metV*, ACETAC_10570; *metF*, ACETAC_10565), CFeSP (*acsD*, ACETAC_10550; *acsC*, ACETAC_10545), метилтрансферазы (*acsE*, ACETAC_10540) и АКС (*acsB*, ACETAC_10535).

Исследование геномной последовательности штамма 3443-3Ac^T выявило присутствие двух генов, кодирующих две СОДГ. Первый, *acsA* (ACETAC_10650), локализован на расстоянии 10,5 кб от кластера генов, ассоциированных с ПВЛ. Второй ген, *cooS* (ACETAC_02795), находится вне этого региона. Аналогичная картина распределения генов наблюдается у *T. kivui*. Учитывая сходный характер расположения в геномах, а также высокую степень гомологии (96%) продукта гена *cooS* с соответствующей последовательностью биохимически охарактеризованного белка *T. kivui* (Schwarz et al., 2020; Jain et al., 2021), можно утверждать, что данный белок представляет собой монофункциональную СОДГ, специализирующуюся на утилизации СО. Продукт гена *acsA*, по всей видимости, является бифункциональным ферментом, участвующим в функционировании ПВЛ.

Завершающие реакции ПВЛ у исследуемого штамма катализируются фосфотрансацетилазой и ацетаткиназой, кодируемыми генами *pta* (ACETAC_06980) и *ackA* (ACETAC_06975) соответственно.

Ключевым компонентом энергозапасющей системы штамма 3443-3Ac^T является Ech-комплекс, кодируемый кластером, состоящим из 9 генов (ACETAC_10680 – ACETAC_10720). Степень гомологии продуктов этих генов с

субъединицами E_{ch}-комплекса *T. kivui*, кодируемого генным кластером TKV_c01230 - TKV_c01310, составляет от 70 до 92% (Schoelmerich and Müller, 2019). Важно отметить, что геном штамма 3443-3Ac^T не содержит генетических детерминант, кодирующих другие известные первичные генераторы трансмембранного потенциала.

Гены, кодирующие F₁F_o-АТФ-синтазу, локализованы в непосредственной близости от *ech*-кластера (ACETAC_10735–ACETAC_10770). Анализ структуры *c*-субъединицы АТФ-синтазы (ACETAC_10765) показал отсутствие аминокислотных мотивов, обеспечивающих связывание ионов натрия (Q...ES/T), при наличии протонсвязывающего сайта (Glu55). Данная особенность, также характерная для *T. kivui*, позволяет отнести АТФ-синтазу штамма 3443-3Ac^T к H⁺-зависимому типу. Таким образом, энергетические потребности клетки штамма 3443-3Ac^T обеспечиваются сопряженной работой E_{ch}-комплекса (генерация протонного градиента) и протонной АТФ-синтазы (синтез АТФ).

7.1.8.2 Генетические детерминанты ацетогенеза у штамма 3443-3Ac^T при росте на формиате

Первым этапом метаболизма формиата является его поступление в клетку, однако в геноме штамма 3443-3Ac^T не обнаружено генов, гомологичных известным транспортерам формиата (PF01226, Form_Nir_trans). Для *A. woodii* было показано, что для роста на высоких концентрациях формиата (50–500 мМ) при pH 7,0 наличие специализированного транспортера не является обязательным. Мутантный штамм *A. woodii* с делецией гена транспортера формиата сохранял способность к росту в указанных условиях благодаря тому, что часть субстрата присутствовала в виде незаряженной муравьиной кислоты (Moon et al., 2021), способной диффундировать через липидный бислой (Falke et al., 2010). При оптимальной концентрации 200 мМ и pH 7,0 (рКа муравьиной кислоты = 3,75) лишь 0,1 мМ субстрата находилось в форме муравьиной кислоты, тогда как 199,9 мМ приходилось на долю формиат-аниона (Moon et al., 2021). К сожалению, способность мутантного штамма *A. woodii* к росту при концентрациях формиата ниже 50 мМ не исследовалась. Штамм 3443-

3Ac^T проявлял рост на 25 мМ формиата при pH 5,8 и температуре 50 °C. При таких условиях концентрация муравьиной кислоты составляет 0,2 мМ, что позволяет предположить, что поступление формиата у исследуемого штамма действительно обеспечивается диффузией незаряженной формы субстрата через мембрану (Рисунок 12). Установлено, что штамм 3443-3Ac^T превращает формиат в ацетат в соотношении 4,2:1 (Рисунок 7Б). Данное соотношение сопоставимо с величиной 4,4:1, полученной для *A. woodii* (Moon et al., 2021). Можно предположить, что путь ацетогенеза из формиата у штамма 3443-3Ac^T в целом аналогичен пути, постулированному для *A. woodii* (Moon et al., 2021), однако с важным отличием: вместо Rnf-комплекса в исследуемом микроорганизме функционирует Ech-комплекс.

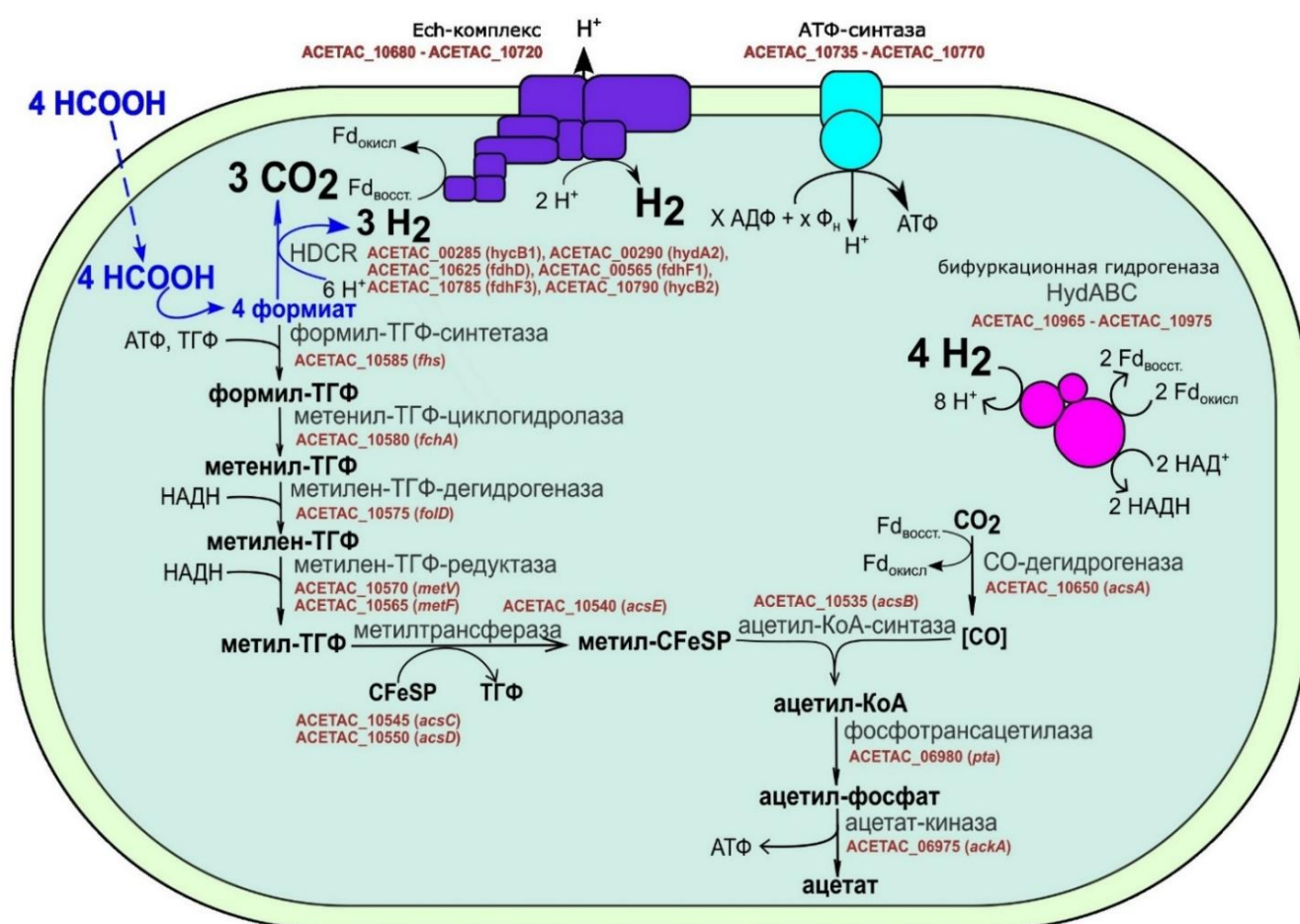


Рисунок 12 – Модель ацетогенеза штамма 3443-3Ac^T при росте на формиате. Прерывистой стрелкой обозначен процесс диффузии.

Согласно предлагаемой схеме, из 4 молекул формиата, вовлеченных в метаболизм, 3 окисляются 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 СО, 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, бифуркационной гидрогеназы HydABC и Ech-комплекса. HydABC окисляет H_2 , продуцируемый HDCR и Ech-комплексом, восстанавливая $\text{Fd}_{\text{окисл}}$ и НАД^+ , тогда как Ech-комплекс окисляет часть $\text{Fd}_{\text{восст}}$, сопрягая этот процесс с образованием H_2 и генерацией хемиосмотического градиента.

7.1.8.3 Генетические детерминанты ацетогенеза у штамма 3443-3Ac^T при росте на СО

Ключевым ферментом, обеспечивающим утилизацию СО, является СОДГ. В геноме штамма 3443-3Ac^T выявлено два гена, кодирующих данный фермент (см. 7.1.8.1). Учитывая высокую степень идентичности аминокислотных последовательностей этих ферментов с биохимически охарактеризованными СОДГ *T. kivui*, можно предположить, что ген ACETAS_10650 представляет собой *acsA* и кодирует СОДГ-компонент в составе комплекса СОДГ/АКС, тогда как ген ACETAS_02795, обозначаемый как *cooS*, отвечает за синтез монофункциональной СОДГ. Следовательно, окисление СО под действием CooS сопровождается восстановлением $\text{Fd}_{\text{окисл}}$, который затем реокисляется комплексом Ech с образованием H_2 и созданием хемиосмотического градиента (Рисунок 13). Предполагается, что часть образующегося водорода используется HDCR для восстановления CO_2 до формиата, а другая часть окисляется бифуркационной гидрогеназой HydABC, обеспечивая синтез НАДН, необходимого для функционирования метильной ветви ПВЛ. СО и формиат далее преобразуются в ацетат через ПВЛ.

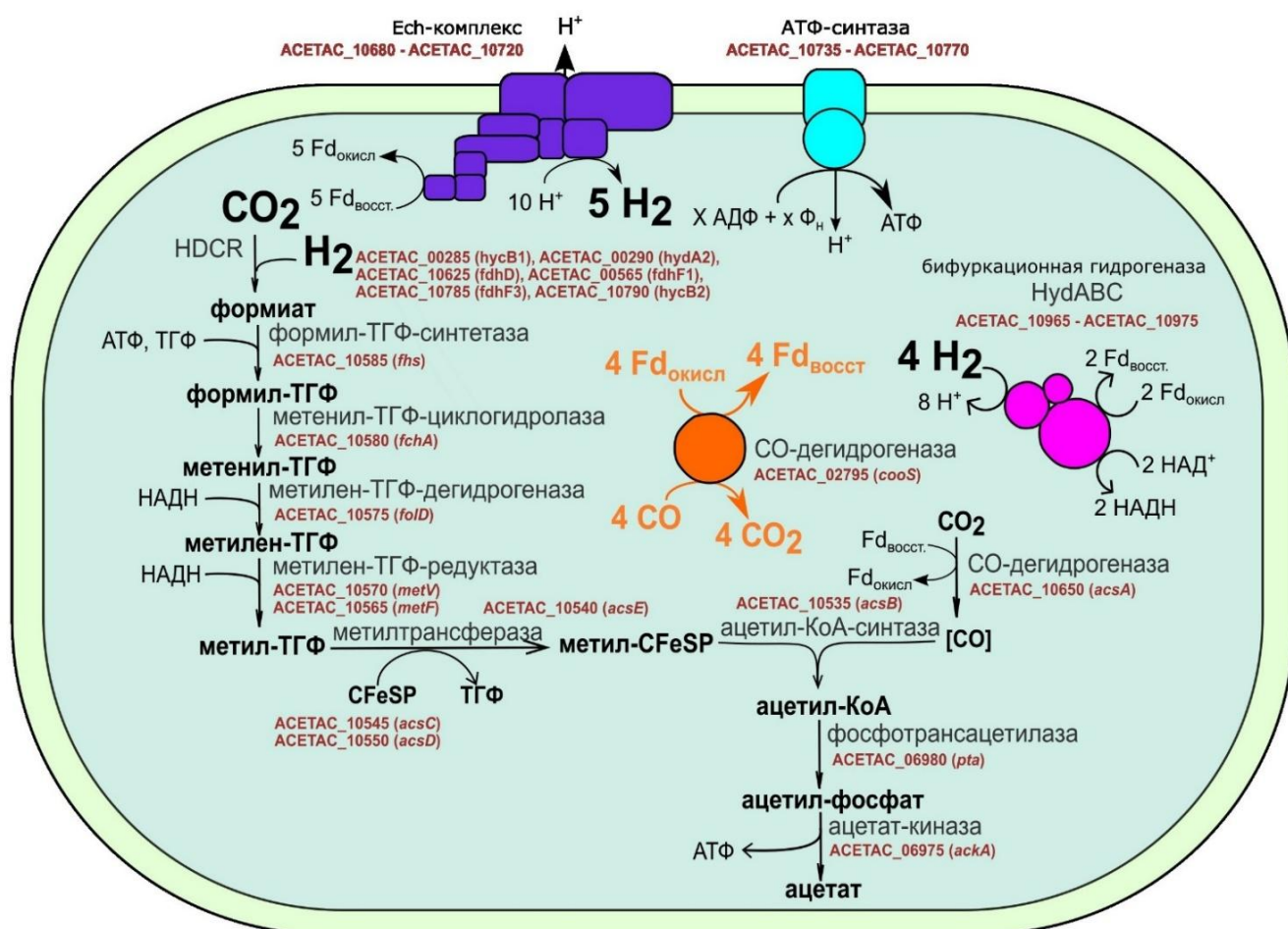


Рисунок 13 – Модель ацетогенеза штамма 3443-3Ac^T при росте на CO.

7.1.8.4 Причины неспособности роста штамма 3443-3Ac^T к гетеротрофному росту

Все представители родов *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacter* и *Caldanaerobacter* (группа TTC) являются хемоорганогетеротрофными бактериями, растущими за счет сбраживания 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.

Для выяснения причин неспособности штамма 3443-3Ac^T расти на углеводах был проведен анализ приобретения и утраты генов в пределах филогенетической группы TTC. Сравнение полных наборов COG, а также COG, вовлеченных в транспорт и метаболизм углеводов (Рисунок 14), выявило у штамма 3443-3Ac^T

значительное сокращение числа генов, связанных с углеводным обменом, тогда как общее количество COG было сопоставимо с таковым у других представителей кластера TTC. *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. Для выявления ключевых утрат был проведен сравнительный анализ уникальных потерь и приобретений у штамма 3443-3Ac^T и *T. kivui* среди COG, участвующих в транспорте и метаболизме углеводов, а также проанализированы парные потери (т. е. утраты, произошедшие параллельно у двух указанных организмов, но отсутствующие у других представителей группы TTC). В целом количество уникальных потерь у штамма 3443-3Ac^T оказалось значительно больше, чем у *T. kivui*, причем эти потери затрагивали главным образом предполагаемые сахар-специфичные или не охарактеризованные 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 сахар-специфичные транспортеры: компоненты фосфотрансферазной системы (PTS), АТФ-связывающие кассетные (ABC) транспортеры, а также другие пермеазы. Что касается PTS, в геноме *T. kivui* обнаружено две полноразмерные системы, состоящие из компонентов ПСВ-ПА и ПА-ПС-ПВ, тогда как в геноме штамма 3443-3Ac^T выявлен лишь фрагмент гена, предположительно кодирующего компонент ЕПВ (ACETAC_00175). Это позволило предположить, что утрата PTS может быть одной из критических потерь, обусловивших переход штамма 3443-3Ac^T к облигатно автотрофному образу жизни. Интересно, что ген, содержащий домен целлюлозофосфорилазы (GH94), присутствует в геномах обоих штаммов, а также у других представителей группы TTC, что может служить дополнительным указанием на функционирование PTS у предков штамма 3443-3Ac^T. К числу парных потерь также относятся гены, кодирующие ферменты, вовлеченные в обмен углеводов: сахарные киназы,

изомеразы и трансферазы, необходимые для взаимопревращений сахаров перед их поступлением в центральные метаболические пути.

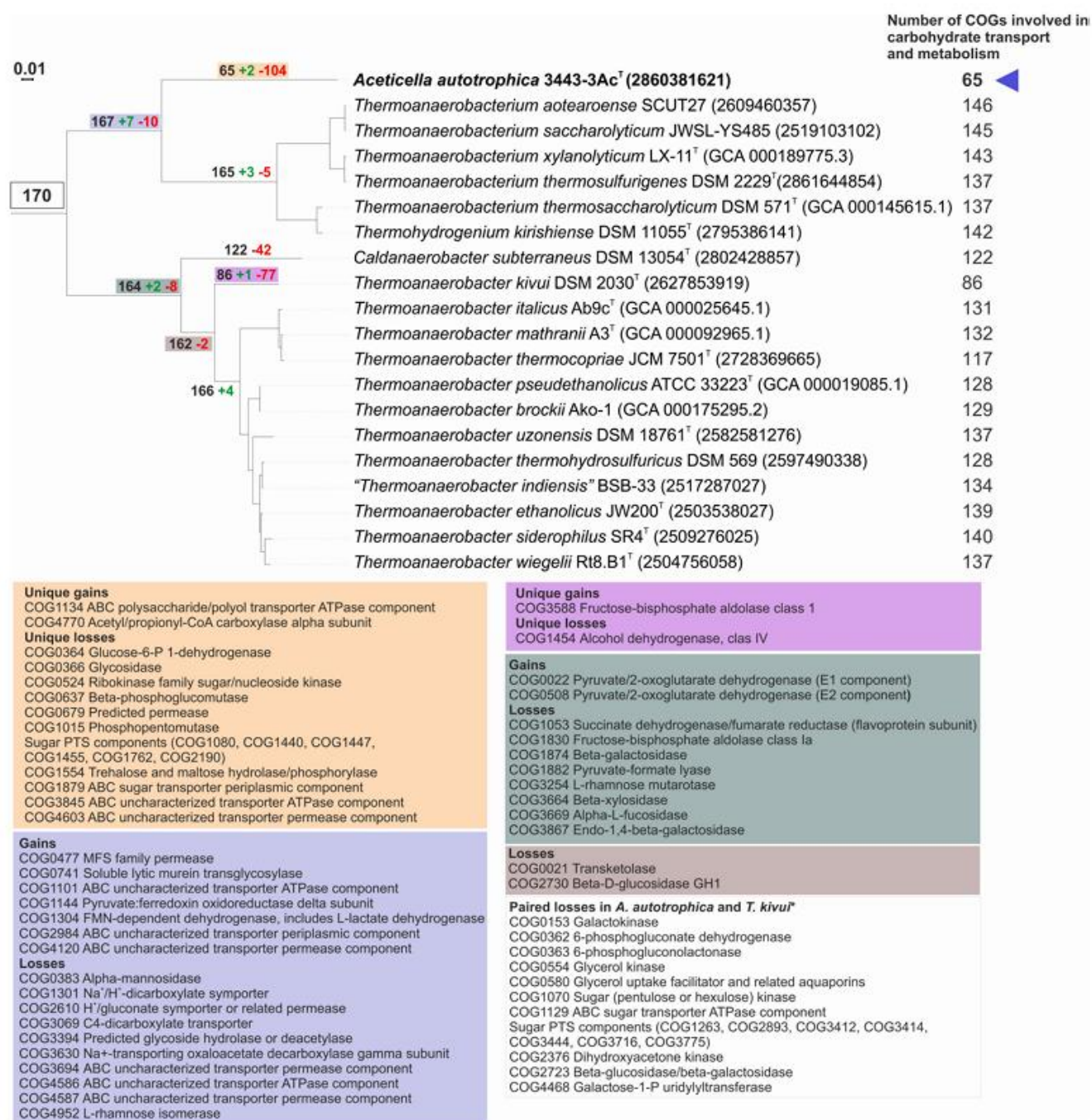


Рисунок 14 – Анализ утрат и приобретений генов, задействованных в транспорте и метаболизме углеводов, в геномах представителей группы ТТС (включая штамм 3443-3Ac^T, выделенный жирным шрифтом). Цветными блоками отмечены перечни утраченных/приобретенных генов и соответствующие узлы на филогенетическом 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).

Ферменты метаболизма галактозы (галактокиназа и галактозо-1-фосфатуридилтрансфераза) также входят в число парных утрат. Окислительная ветвь пентозофосфатного пути у обоих организмов нарушена в связи с утратой фосфоглюконолактоназы и 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.

7.1.8.5 Генетические детерминанты метаболизма серы у штамма 3443-3Ac^T

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. Он осуществляет НАД(Ф)Н-зависимое восстановление S⁰ и полисульфида, обеспечивая тем самым футильный сброс электронов (Рисунок 15). 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.

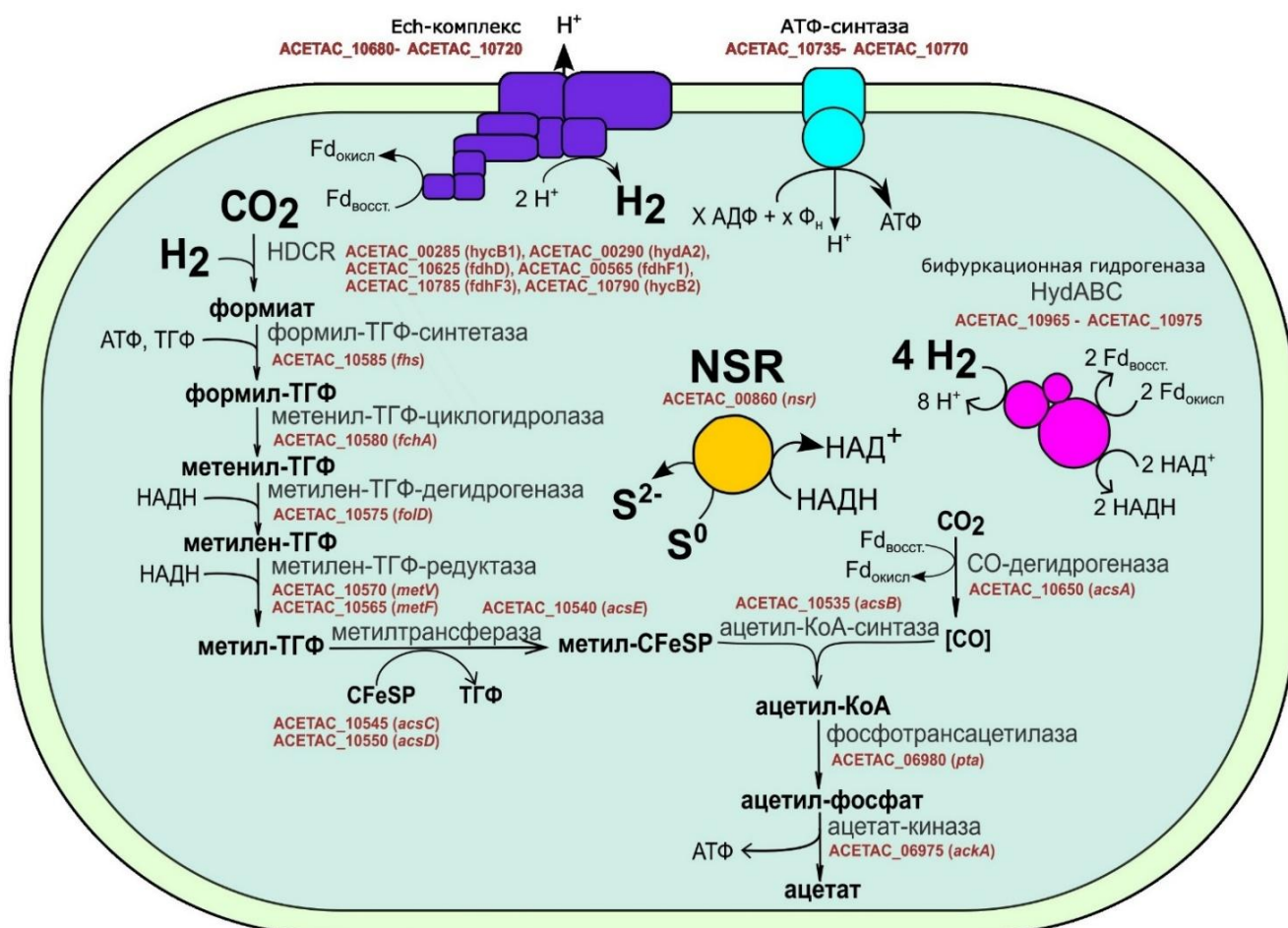


Рисунок 15 – Модель ацетогенеза штамма 3443-3Ac^T при росте на CO₂/H₂ в присутствии S⁰. NSR – НАД(Ф)Н:полисульфид-оксидоредуктаза.

Как было отмечено выше, штамм 3443-3Ac^T был выделен из горячего источника кальдеры Узон. Активные вулканические процессы, протекающие в этом регионе, обеспечивают постоянное присутствие в среде различных серных соединений. Механизм «облегченного» ацетогенеза с участием серных соединений позволяет исследуемой облигатно автотрофной ацетогенной бактерии увеличивать энергетический выход осуществляемого процесса и выдерживать в природном сообществе конкуренцию с гидрогенотрофными метаногенами и сульфатредукторами.

7.2 Штамм 75b-Ас

Штамм 75b-Ас был получен из пробы скважины 75-бис ЕММВ. Сравнение полной последовательности гена 16S рРНК нового изолята с последовательностями

из баз данных показало сходство 99,62% с последовательностью штамма 3443-3Ac^T, выделенного ранее из горячего источника кальдеры Узон на Камчатке. Клетки нового микроорганизма из ЕММВ были одиночными неподвижными палочками. Штамм 75b-Ас являлся облигатным анаэробом, оптимальными условиями его роста были 50 °С и рН 6,0, что соответствовало оптимуму, установленному для штамма 3443-3Ac^T. Микроорганизм из ЕММВ осуществлял хемолитоавтотрофный ацетогенез, используя Н₂ в качестве донора электронов и СО₂ в качестве акцептора электронов. Единственным продуктом метаболизма штамма 75b-Ас был ацетат. Анализ генома штамма 75b-Ас также показал функционирование механизма ацетогенеза, аналогичного описанному для штамма 3443-3Ac^T. Значения ANI и AAI, которые были рассчитаны для штаммов 3443-3Ac^T и 75b-Ас, а также для генома MAG_Yes75-02, собранного из метабенома микробного сообщества пробы 75-бис, показали высокую степень сходства (Таблица 3).

Таблица 3 – Значения средней идентичности нуклеотидов (Average Nucleotide Identity, ANI) и средней идентичности аминокислот (Average Amino Acid Identity, AAI), рассчитанные для штаммов 3443-3Ac (Камчатка) и 75b-Ас (ЕММВ), а также для MAG_Yes75_02, полученного на основе результатов метабеномного секвенирования микробного сообщества скважины 75-бис.

	3443-3Ac^T	75b-Ас	MAG_Yes75-02
	ANI, %		
3443-3Ac^T	100		
75b-Ас	97,04	100	
MAG_Yes75-02	97,14	99,92	100
	AAI, %		
3443-3Ac^T	100		
75b-Ас	96,26	100	
MAG_75bis	96,45	99,96	100

Изложенные факты, а также филогенетический анализ на основе набора консервативных белков *bac120* (Рисунок 16) позволили установить принадлежность штамма 75b-Ас к роду *Aceticella*.

Таким образом, из подземной биосферы ЕММВ была выделена облигатно хемолитоавтотрофная ацетогенная бактерия *Ac. autotrophica* 75b-Ас, которая составляла более 90% микробного сообщества (Рисунок 4), что не характерно для

ацетогенных микроорганизмов в природных сообществах. Скважина 75-бис не содержала серных соединений, что делало невозможным механизм «облегченного» ацетогенеза, предложенный для родственного штамма 3443-3Ac^T, выделенного из горячего источника кальдеры Узон. Однако в водоносном горизонте скважины 75-бис детектировалось повышенное содержание CO₂ в газовой фазе и высокое значение газового фактора, что позволяет предположить ключевую роль высоких концентраций CO₂ в поддержании высокой численности *Ac. autotrophica* 75b-Ac в микробном сообществе вод скважины 75-бис. Стабильное доминирование данного микроорганизма в сообществе позволяет предположить для него роль первичного продуцента.

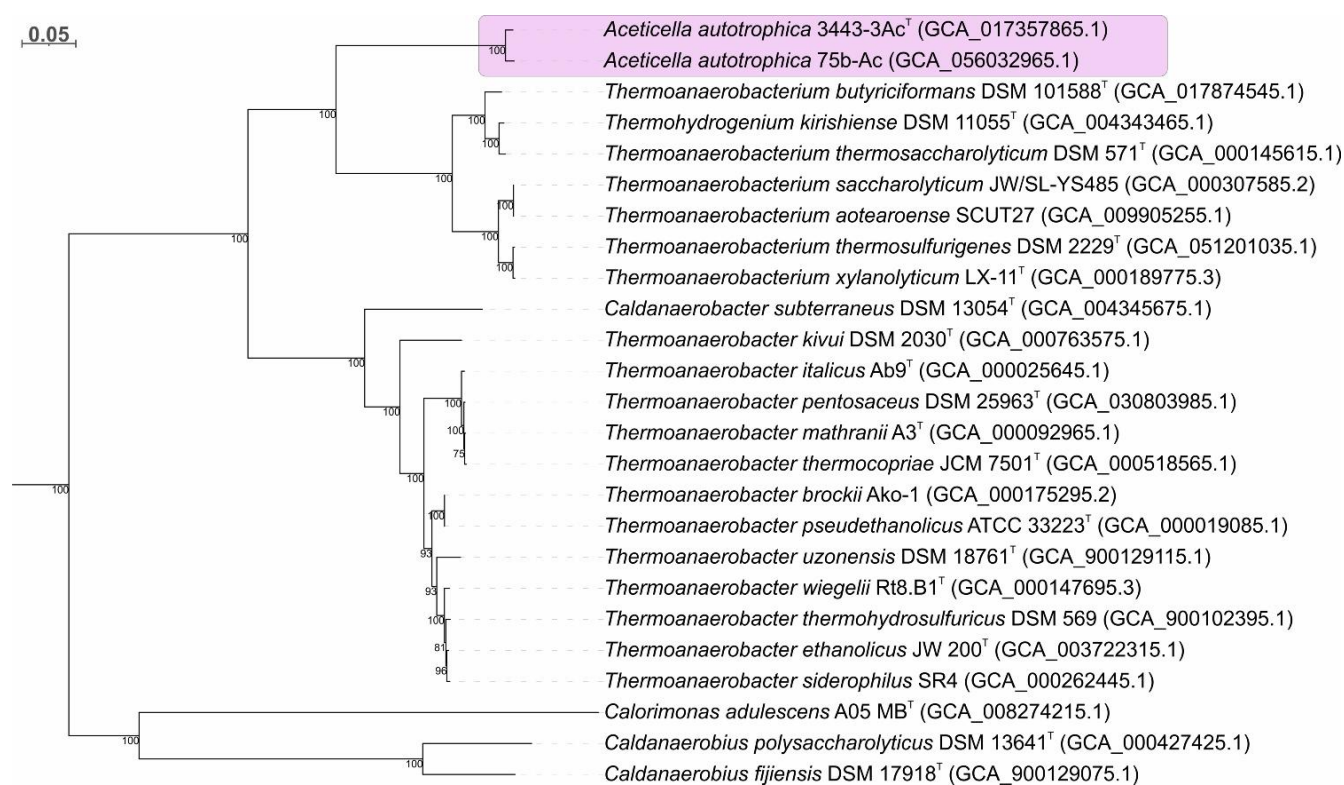


Рисунок 16 – Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия на основе набора консервативных белков bac120. Розовым показано положение штаммов 75b-Ac и 3443-3Ac^T среди родственных таксонов. Масштаб: 0,05 замен на аминокислотную позицию с поправками, рассчитанными моделью. В качестве внешней группы были использованы *Mycoplasma mycoides* PG^T и *Bacillus subtilis* 168^T (на рисунке не показаны).

ГЛАВА 8. 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 (= DSM 113908 и KCTC 25490). 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 была 70 °C.

8.1 Морфология штамма 3819-GS1

Клетки штамма 3819-GS1 имели палочковидную форму, диаметр 0,5–0,6 мкм и длину 2–6 мкм, располагались одиночно. Подвижность наблюдалась на экспоненциальной фазе роста, при исследовании негативно окрашенных препаратов (Рисунок 17А) было показано наличие 1 жгутика. Штамм 3819-GS1 формировал круглые терминальные эндоспores после продолжительного (14 суток) культивирования при 65 °C; доля клеток, образывавших споры, не превышала 5%. На ультратонких срезах клеток (Рисунок 17Б) был выявлен грамположительный тип клеточной стенки.

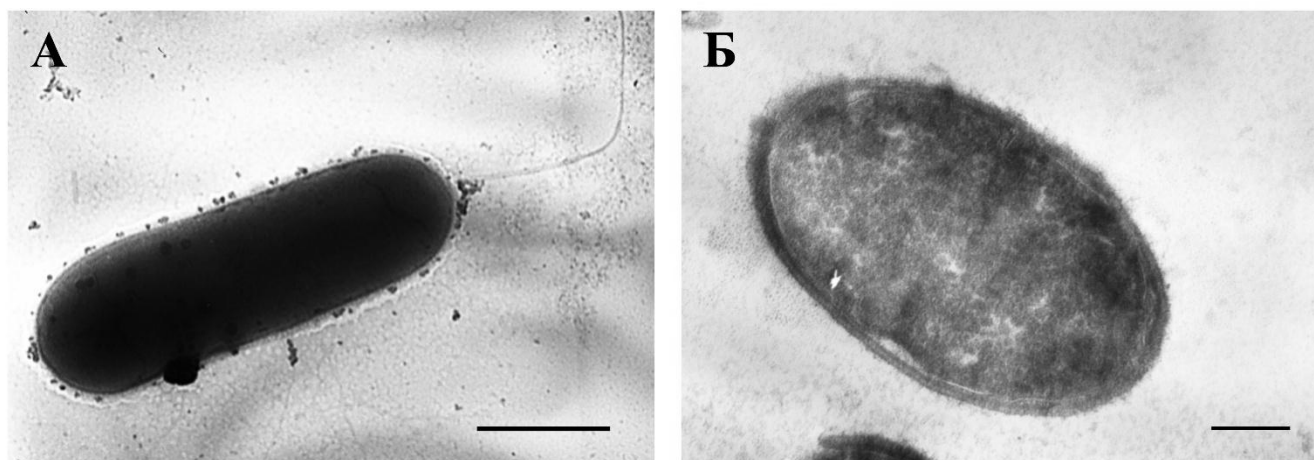


Рисунок 17 – Морфология и ультраструктура клеток ‘*Acetitalea autotrophica*’ 3819-GS1: (А) электронная микроскопия, препараты целых клеток (окраска фосфовольфрамовой кислотой), масштаб 0,5 мкм; (Б) электронная микроскопия, ультратонкие срезы (окраска уранилацетатом), масштаб 0,1 мкм.

8.2 Характеристики роста штамма 3819-GS1

Штамм 3819-GS1 являлся строго анаэробным микроорганизмом, рост которого происходил исключительно в присутствии сульфида натрия при низких значениях ОВП. Способность к росту проявлялась в интервале температур от 47 до 75 °С, причем максимальные значения скорости роста достигались в диапазоне 65–70 °С (Рисунок 18А). Увеличение продолжительности культивирования до 14 суток не приводило к появлению роста при 37 °С и ниже, а также при 80 °С и выше.

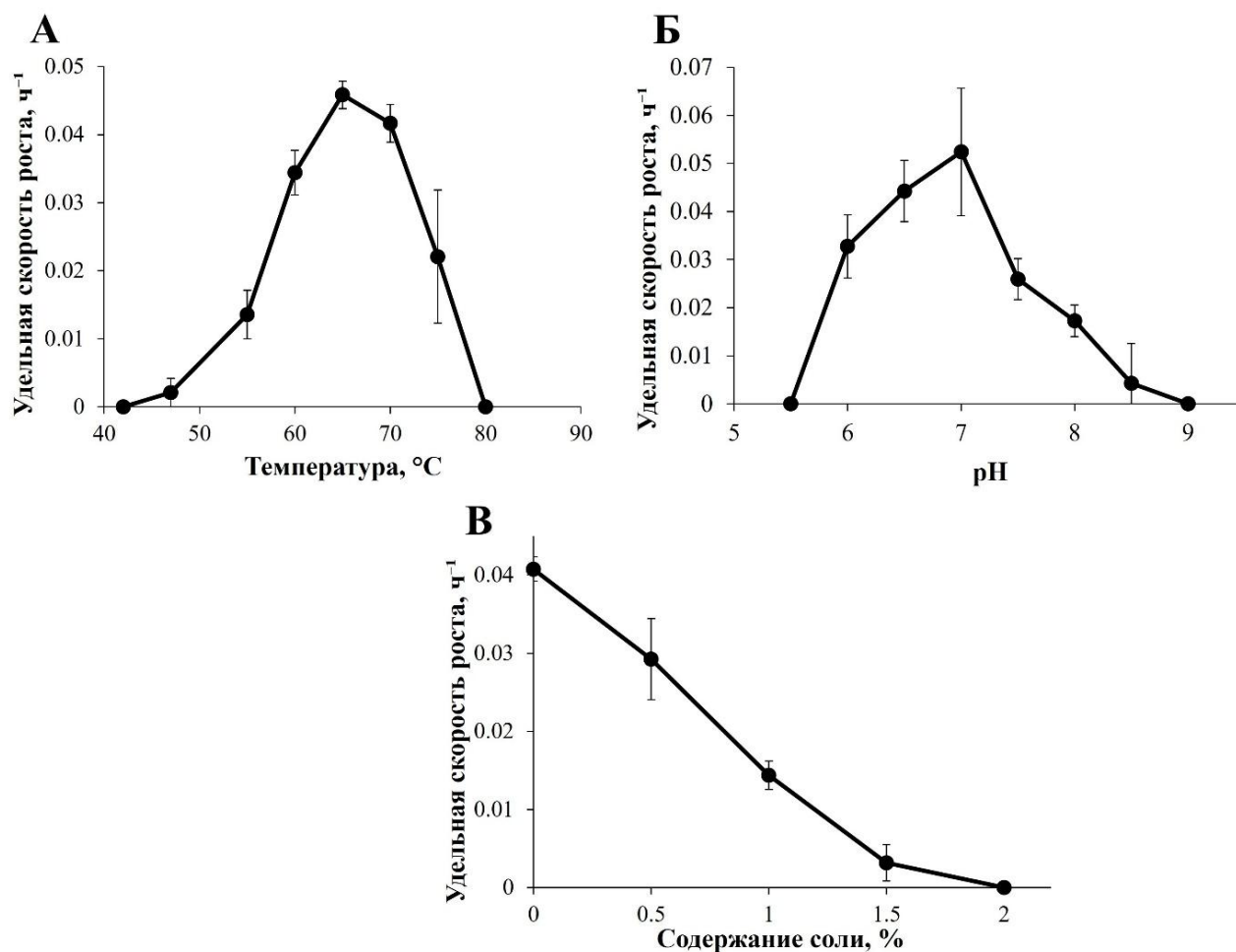


Рисунок 18 – Влияние температуры (А), pH (Б) и NaCl (В) на рост штамма 3819-GS1. На графиках отражены результаты, полученные вычислением среднего значения из трех повторностей.

Диапазон pH для роста находился в пределах 6,0–8,5 с оптимумом при pH 7,0 (Рисунок 18Б). Рост не был показан при значениях pH 5,5 и ниже, а также при pH 9,0 и выше. Культура росла при концентрациях NaCl до 1,5% (Рисунок 18В), 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 2% NaCl и более. Штамм 3819-GS1 проявлял способность к развитию на среде, не содержащей витаминов, причем в таких условиях выход биомассы и скорость роста не изменялись на протяжении 10 последовательных пересевов. Время удвоения при культивировании в оптимальных условиях (температура 65 °C, pH 7,0, без дополнительного внесения NaCl) составляло 15 часов.

8.3 Метаболизм штамма 3819-GS1

8.3.1 Доноры электронов, используемые штаммом 3819-GS1

Штамм 3819-GS1 оптимально рос в хемолитоавтотрофных условиях в присутствии H_2 в качестве донора электронов и $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ в качестве источника углерода и акцептора электронов (Рисунок 19). Единственным конечным продуктом метаболизма в данных условиях являлся ацетат.

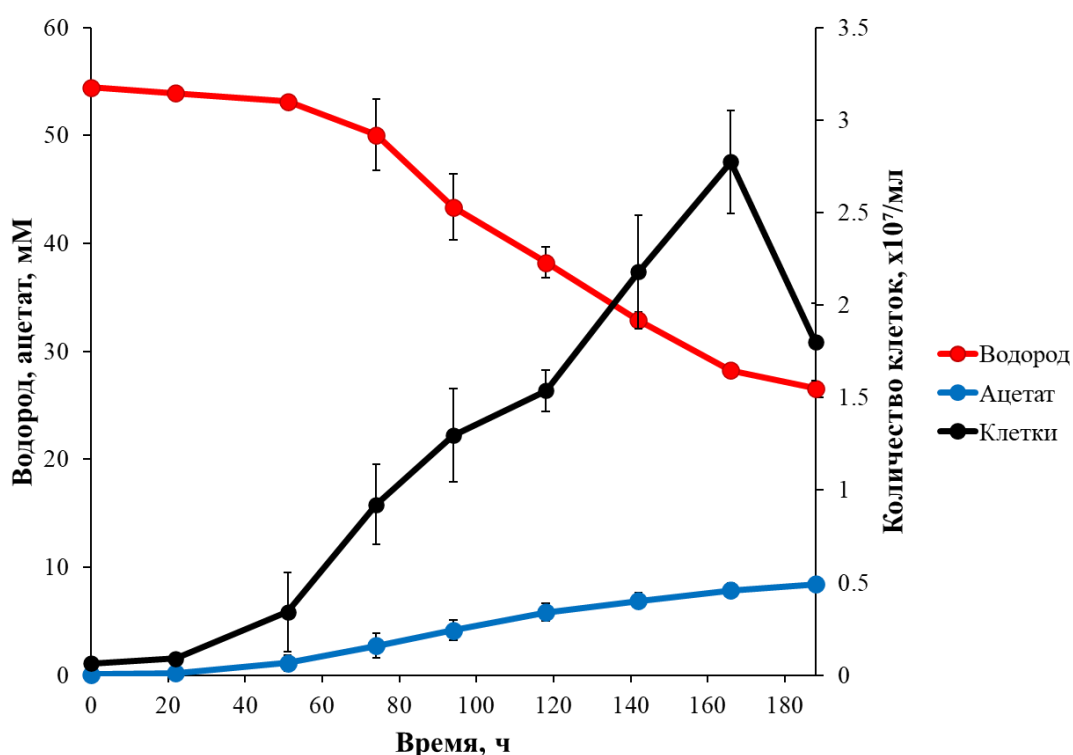


Рисунок 19 – Рост и образование ацетата штаммом 3819-GS1 при 65 °C и pH 7,0 в присутствии H_2 и CO_2 . На графике отражены результаты, полученные вычислением среднего значения из трех повторностей.

Скрининг широкого спектра соединений показал, что штамм 3819-GS1 не способен также утилизировать органические субстраты. 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 и рибоза (0,5, 2 и 5 г/л). Кроме того, культура не метаболизировала глицерол (0,5, 2 и 5 г/л), серин, глицин, ацетат, лактат, пируват, малат, пропионат, бутират, фумарат, сукцинат, цитрат, этанол, пропанол, изопропанол, глицерин, метанол (5, 20 и 40 мМ), а также МАС, такие как 2-метоксифенол, 3,4-диметоксибензоат, 2-метоксибензоат (1, 5 и 10 мМ).

8.3.2 Акцепторы электронов, используемые штаммом 3819-GS1

Единственным акцептором электронов, который использовался штаммом 3819-GS1, был $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$. Новый изолят не был способен использовать в качестве альтернативных акцепторов электронов S^0 (10 г/л), тиосульфат, сульфат, сульфит, нитрит, нитрат и перхлорат (10 мМ каждого).

8.4 Отношение штамма 3819-GS1 к антибиотикам

Было показано, что штамм 3819-GS1 был чувствителен к канамицину, тетрациклину, ампициллину и хлорамфениколу и эритромицину, для которых МИК составляла 50 мкг/мл.

8.5 Рост штамма 3819-GS1 на твердых средах

Для штамма 3819-GS1 была показана способность к образованию колоний на агарозе (2,5 %) и агаре (2,5 %), но не на гелерите (1,5 %). Оптимальным же оказался рост на агарозе. Образование наибольшего количества колоний наблюдалось на агарозе с 13 мл газовой фазы, содержащей H_2/CO_2 1:1. В качестве инокулята использовалась культура штамма на стадии поздней экспоненты. Оптимальная температура роста колоний штамма 3819-GS1 была ниже оптимальной температуры роста на жидкой среде и составляла 55 °C.

Таблица 4 – Основные характеристики, отличающие род '*Acetitalea*' gen. nov. от родов *Neomoorella* (Fontaine et al., 1942; Slobodkin et al., 1997; Balk et al., 2003; Nepomnyashchaya et al., 2012; Alves et al., 2013; Slobodkina et al., 2022; Vecchini Santaella et al., 2023; Böer et al., 2024a; Santaella et al., 2023; Galani et al., 2025) и *Thermanaeromonas* (Mori et al., 2002; Gam et al., 2016). Количество видов указано в скобках. +, положительный; –, отрицательный; V, признак варьирует у разных видов; ND, не определено.

Признак	' <i>Acetitalea</i> ' (1)	<i>Neomoorella</i> (10)	<i>Thermanaeromonas</i> (2)
Источник выделения	Горячий источник	Горячие источники, метантенки, термофильный биореактор, перерабатывающий твердые бытовые отходы в присутствии метанола, почва, подземное хранилище газа	Геотермальные водоносные горизонты на глубине ≈500 м
Морфология	Палочковидные одиночные клетки	Палочковидные клетки, встречаются поодиночке, в парах или цепочках в зависимости от фазы роста и условий культивирования	Палочковидные одиночные клетки
Клеточная стенка	Грамположительное строение клеточной стенки и положительный результат окрашивания по Граму	Клеточная стенка имеет грамположительное строение, результаты окрашивания по Граму в большинстве случаев тоже положительные, но иногда встречается отрицательное окрашивание на поздних стадиях роста культуры	Клеточная стенка имеет грамположительное строение, но результаты окрашивания по Граму различные
Подвижность	+	V	–
Образование спор	+	+	+
Температура роста (°C)			
Диапазон	47–75	36–70	55–73
Оптимум	65–70	55–65	65–70
pH роста			
Диапазон	6,0–8,5	4,5–8,5	5,5–9,0
Оптимум	7,0	6,3–7,5	6,5–7,5
NaCl для роста (%)			
Диапазон	0–1,5	0–4,5	0–2
Оптимум	0	0–1	0

Таблица 4 – Продолжение.

Признак	<i>'Acetitalea'</i> (1)	<i>Neomoorella</i> (10)	<i>Thermanaeromonas</i> (2)
Хемоорганогетеротрофный рост	–	+	+
Хемолитогетеротрофный рост	–	ND	V
Хемолитоавтотрофный рост	+	–	V
Глюкоза	–	V	+
Фруктоза	–	+	+
Галактоза	–	V	V
Манноза	–	V	+
Ксилоза	–	V	V
Целлобиоза	–	V	V
Лактоза	–	V	V
Мальтоза	–	V	V
Сахароза	–	V	V
Крахмал	–	V	V
Ксилан	–	ND	V
Сульфат	–	–	–
Сера	–	–	–
Тиосульфат	–	+	+
Нитрат	–	V	V
Рост на СО	–	+	ND
Способность к ацетогенезу	+	V	–
Доля Г+Ц (моль%)	55,69	53,42–57,6	49,6–60,2

8.6 Филогенетическая характеристика штамма 3819-GS1

С помощью гибридного секвенирования на платформах Illumina NovaSeq 6000 и Oxford Nanopore была определена полная геномная последовательность штамма 3819-GS1, которую удалось собрать в одну кольцевую хромосому. Длина полученной хромосомной последовательности составляла 1,887,831 нуклеотидов. Доля Г+Ц *in silico* была равна 55,69 мол.%. В результате использования автоматических методов для предсказания генов и их аннотации было детектировано 1984 белок-кодирующих генов и 54 гена, кодирующих РНК.

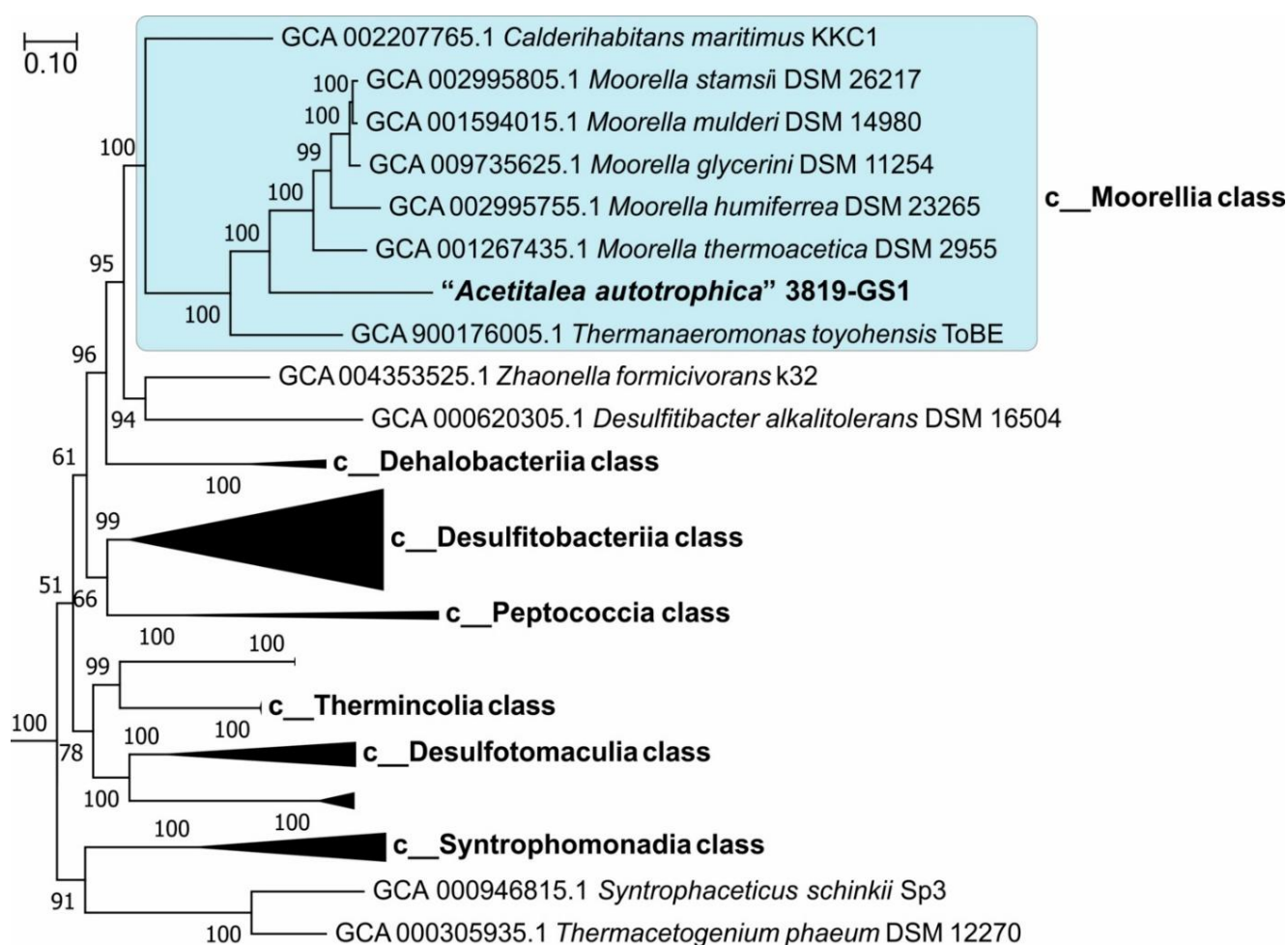


Рисунок 20 – Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия на основе набора консервативных белков *bac120*. Показано положение штамма 3819-GS1 (выделен жирным шрифтом) среди родственных таксонов. Цифры в узлах показывают значения бутстрэп-поддержки. Масштаб: 0,1 замена на аминокислотную позицию с поправками, рассчитанными моделью. В качестве внешней группы использован *Melioribacter roseus* P3M-2^T (на рисунке не показан). Название рода *Mooreella* на данном рисунке соответствует новому валидному названию *Neomooreella* (Gtari and Ventura, 2025).

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 с *Moorellia* (филум Bacillota) (Рисунок 20).

Таким образом, на основании фенотипических (Таблица 4), 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.

8.7 Анализ генома штамма 3819-GS1

Окислительный модуль ацетогенеза у штамма 3819-GS1 представлен бифуркационной гидрогеназой HydABCD (ABQ270_05085 – ABQ270_05095), которая катализирует окисление молекулярного водорода, сопряженное с восстановлением НАД⁺ и Fd_{окисл} в эквимольном соотношении (Рисунок 21). Часть полученного Fd_{восст} вовлекается в реакции восстановительного модуля, тогда как оставшаяся часть окисляется в энергетическом модуле, обеспечивая генерацию протонного градиента на мембране.

В ходе анализа генома штамма 3819-GS1 не было идентифицировано генов, кодирующих ферменты ПВЛ, являющегося классическим для восстановительного модуля ацетогенеза. Однако был выявлен 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 CO₂.

Первую реакцию восстановительного глицинового пути катализирует форматдегидрогеназа. В геноме исследуемого штамма выявлено четыре гена, кодирующих форматдегидрогеназные каталитические субъединицы. Три из них

(*fdhF1*, ABQ270_03180; *fdhF2*, ABQ270_03190; *fdhF3*, ABQ270_03195) локализованы в едином кластере с геном оксидоредуктазы неустановленной субстратной специфичности (ABQ270_03185). Четвертый ген формиатдегидрогеназы (*fdhF4*, ABQ270_04035) входит в состав другого кластера, содержащего два гена каталитических субъединиц [FeFe]-гидрогеназ (*hydA1*, ABQ270_04040; *hydA2*, ABQ270_04045). Вопрос о том, какая из перечисленных формиатдегидрогеназ задействована в глициновом пути, а также природа донора электронов (НАД(Ф)Н, ФАДН₂ или Fd_{восст}) для этой реакции остаются невыясненными. Образовавшийся формиат подвергается АТФ-зависимой активации до формил-ТГФ при участии ТГФ-синтетазы (*fhs*, ABQ270_02565). На последующем этапе бифункциональный фермент метенил-ТГФ-циклогидролаза/метилен-ТГФ-дегидрогеназа (*fchA/fold*, ABQ270_05435) восстанавливает формил-ТГФ до метилен-ТГФ, используя в качестве донора электронов НАДН.

Далее в процесс вступает глицин-расщепляющая система, включающая аминометилтрансферазу (*amt*, ABQ270_03980), Н-белок (*gcsH*, ABQ270_03985), глициндегидрогеназу (*gldC*, ABQ270_03990) и липоилтрансферазу (*dld*, ABQ270_03995). На этой стадии из метилен-ТГФ, СО₂ и аммиака синтезируется глицин, что сопровождается окислением одной молекулы НАДН.

Образовавшийся глицин затем превращается в ацетилфосфат при участии глицинредуктазного комплекса (*grdABCD*, ABQ270_09515 – ABQ270_09535; *trxAB*, ABQ270_09540 – ABQ270_09545), активность которого зависит от наличия восстановленного тиоредоксина. Завершающая реакция катализируется ацетаткиназой (*ackA*, ABQ270_06560), превращающей ацетилфосфат в ацетат, в результате чего происходит образование одной молекулы АТФ.

Таким образом, в реакциях восстановительного глицинового пути на стадии, катализируемой формил-ТГФ-синтетазой, расходуется 1 молекула АТФ, а на стадии ацетаткиназной реакции образуется 1 молекула АТФ, то есть, суммарный баланс АТФ в этом модуле ацетогенеза равен нулю. Следовательно, механизм

запасания энергии у штамма 3819-GS1, по-видимому, связан исключительно с функционированием ЭТЦ и АТФ-синтазы.

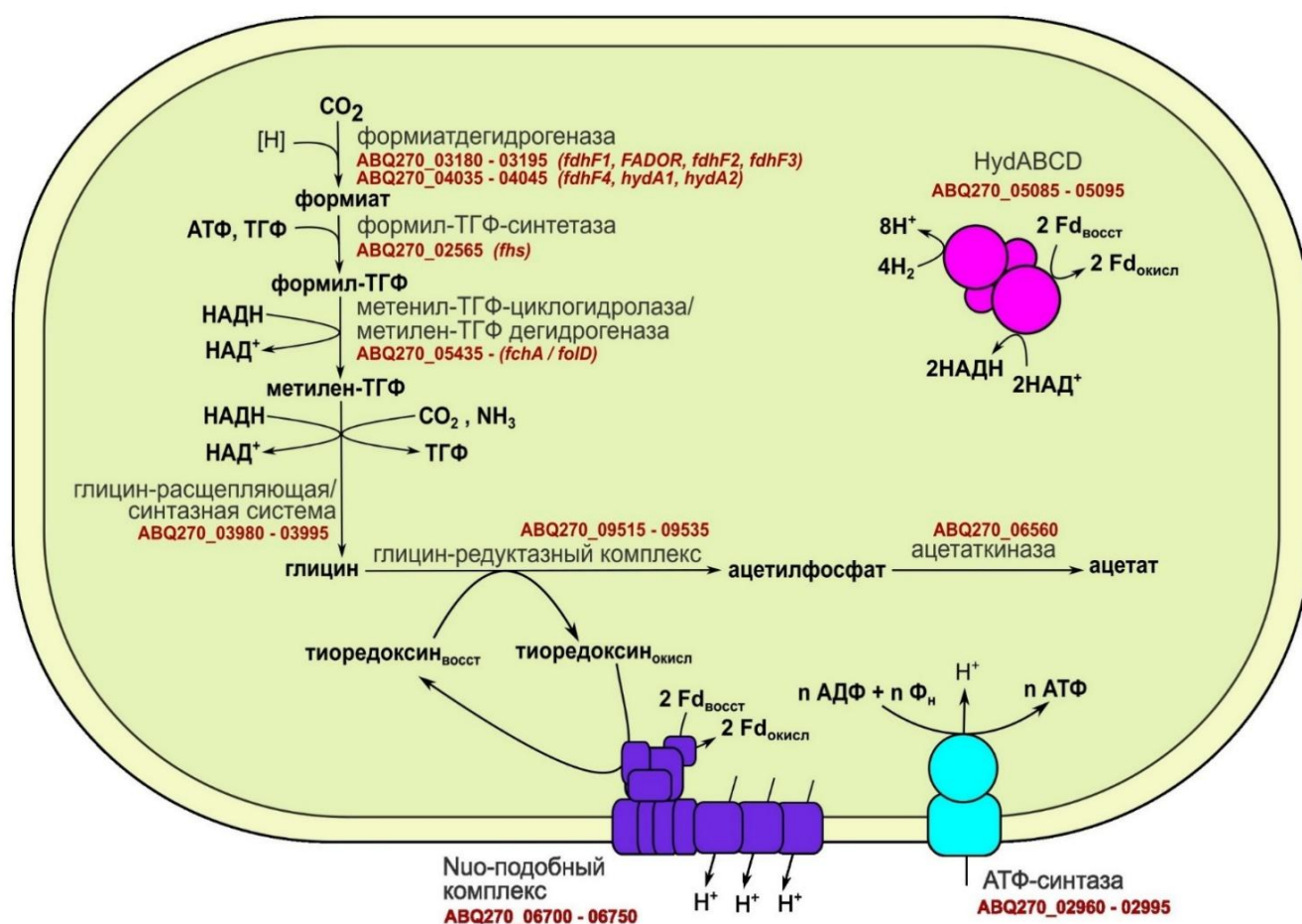


Рисунок 21 – Модель ацетогенеза штамма 3819-GS1 при росте на H₂ и CO₂.

Анализ генома штамма 3819-GS1 показал отсутствие генов, кодирующих как Rnf-, так и Ech-комплексы. Однако были выявлены гены, кодирующие 11-субъединичный мембранный комплекс, гомологичный НАДН:убихиноноксидоредуктазе (*nuoABCDHIJKLMN*, ABQ270_06700 – ABQ270_06750). При этом в геноме отсутствовали гены *nueEFG*, кодирующие N-модуль данного комплекса, ответственный за окисление НАДН. Предполагается, что такой Nuo-подобный комплекс (без NueEFG) принимает участие в окислении Fd_{восст}, 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). Nuo-подобный

комплекс был единственным мембранным комплексом, способным выполнять роль первичного генератора электрохимического потенциала, который удалось выявить в ходе анализа генома штамма 3819-GS1.

Выявленные субъединицы указанного мембранного комплекса проявляют гомологию не только с компонентами НАДН:убихиноноксидоредуктазы, но также с белками, входящими в состав следующих систем:

1. Мембраносвязанных [NiFe]-гидрогеназ (МВН, в том числе Ech, Huf и родственных им гидрогеназ, а также комплексов, гомологичных формиат-водород лиазам и СОДГ *Thermococcus*), которые окисляют $Fd_{\text{восст}}$, F_{420} , формиат или СО (с участием дополнительных субъединиц) и восстанавливают H^+ до H_2 , сопрягая этот процесс с генерацией мембранного потенциала;
2. Мембраносвязанных сульфановых сероредуктаз (MBS), окисляющих $Fd_{\text{восст}}$ и восстанавливающих сульфановую серу, что также сопровождается созданием протонного градиента;
3. Мембраносвязанных НАДН-дегидрогеназоподобных комплексов 1 типа (NDH), которые используют $Fd_{\text{восст}}$ в качестве донора электронов, а пластохинон – в качестве акцептора.

Все перечисленные комплексы объединяет отсутствие субъединиц, гомологичных NuoEFG, а следовательно, и неспособность окислять НАДН. Донором электронов для них служит исключительно $Fd_{\text{восст}}$. Исходя из этого, было предположено, что обнаруженный у штамма 3819-GS1 мембранный комплекс также функционирует как ферредоксин-окисляющая система, сопряженная с генерацией мембранного потенциала. Данный комплекс не относится к гидрогеназам и не способен восстанавливать протоны, поскольку в субъединице, гомологичной EchE, отсутствуют Ni-связывающие мотивы. В качестве акцептора электронов он потенциально может использовать либо хиноны, либо сульфановую серу, входящую в состав тиоредоксина. 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 $Fd_{\text{восст}}$, сопряженное с восстановлением тиоредоксина и генерацией мембранного потенциала.

При анализе генома штамма 3819-GS1 были также идентифицированы гены, кодирующие субъединицы F_1F_0 -АТФ-синтазы (ABQ270_02960 – ABQ270_02995).

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 котором 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 C1-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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бонч-Осмоловская Е.А. Изучение термофильных микроорганизмов в Институте микробиологии РАН // Микробиология. – 2004. – Т. 73. – № 5. – С. 644–658.
2. Кевбрин В.В., Заварзин Г.А. Влияние соединений серы на рост галофильной гомоацететной бактерии *Acetohalobium arabaticum* // Микробиология. – 1992. – Т. 62. – № 5. – С. 812–817.
3. Хомякова М.А., Слободкин А.И. Трансформация метоксилированных ароматических соединений анаэробными микроорганизмами // Микробиология. – 2023. – Т. 92. – №2. – С. 111–134.
4. Adamse A.D. New Isolation of *Clostridium aceticum* (Wieringa) // Antonie van Leeuwenhoek. – 1980. – V.46. – P. 523–531.
5. Allaart M.T., Diender M., Sousa D.Z., Kleerebezem R. Overflow metabolism at the thermodynamic limit of life: How carboxydutrophic acetogens mitigate carbon monoxide toxicity // Microb Biotechnol. – 2023. – V. 16. – № 4. – P. 697–705.
6. Alqahtani M.F., Bajracharya S., Katuri K.P., Ali M., Ragab A., Michoud G., Daffonchio D., Saikaly P.E. Enrichment of *Marinobacter* sp. and halophilic homoacetogens at the biocathode of microbial electrosynthesis system inoculated with Red sea brine pool // Front Microbiol. – 2019. – V. 10. – P. 2563.
7. Alves, J.I., van Gelder, A.H., Alves, M.M., Sousa, D.Z., Plugge, C.M. *Moorella stamsii* sp. nov., a new anaerobic thermophilic hydrogenogenic carboxydutroph isolated from digester sludge // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2013. – V. 63. – P. 4072–4076
8. Andreesen J.R., Gottschalk G., Schlegel H.G. *Clostridium formicoaceticum* nov. spec. isolation, description and distinction from *C. aceticum* and *C. thermoaceticum* // Arch Mikrobiol. – 1970. – V. 72. – № 2. – P. 154–174.
9. Arendsen A.F., Soliman M.Q., Ragsdale S.W. Nitrate-dependent regulation of acetate biosynthesis and nitrate respiration by *Clostridium thermoaceticum* // J Bacteriol. – 1999. – V. 181. – P. 1489–1495.

10. Arndt D., Grant J.R., Marcu A., Saied T., Pon A., Liang Y., Wishart D.S. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V.44. – W16–W21.
11. Bache R., Pfennig N. Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields // *Arch. Microbiol.* – 1981. – V. 130. – P. 255–261.
12. Baffert C., Bertini L., Lautier T., Greco C., Sybirna K., Ezanno P., Etienne E., Soucaille P., Bertrand P., Bottin H., Meynial-Salles I., De Gioia L., Léger C. CO disrupts the reduced H-cluster of FeFe hydrogenase. A combined DFT and protein film voltammetry study // *Journal of the American Chemical Society.* – 2011. – V. 133. – № 7. – P. 2096–2099.
13. Balk M., Mehboob F., van Gelder A.H., Rijpstra W.I., Damste J.S., Stams A.J. (Per)chlorate reduction by an acetogenic bacterium, *Sporomusa* sp., isolated from an underground gas storage // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2010. – V. 88. – P. 595–603.
14. Balk M., van Gelder T., Weelink S.A., Stams A.J. (Per)chlorate reduction by the thermophilic bacterium *Moorella perchloratireducens* sp. nov., isolated from underground gas storage // *Appl Environ Microbiol.* – 2008. – V. 74. – № 2. – P. 403–409.
15. Balk M., Weijma J., Friedrich M.W., Stams A.J.M. Methanol utilization by a novel thermophilic homoacetogenic bacterium, *Moorella mulderi* sp. nov., isolated from a bioreactor // *Arch. Microbiol.* – 2003. – V. 179. – P. 315–320.
16. Bar-Even A. Does acetogenesis really require especially low reduction potential? // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2013. – V. 1827. – № 3. – P. 395–400.
17. Basen M., Müller V. “Hot” acetogenesis // *Extremophiles.* – 2017. – V. 21. – №1. – P. 15–26.
18. Bäumler M., Burgmaier V., Herrmann F., Mentges J., Schneider M., Ehrenreich A., Liebl W., Weuster-Botz D. Continuous production of ethanol, 1-butanol and 1-hexanol from CO with a synthetic co-culture of clostridia applying a cascade of stirred-tank bioreactors // *Microorganisms.* – 2023. – V. 11. – P. 1003.

19. Beaty P.S., Ljungdahl L.G. Thiosulfate reduction by *Clostridium thermoaceticum* and *Clostridium thermoautotrophicum* during growth on methanol // Ann Meet Am Soc Microbiol Abstr. – 1990. – V.1. – P. 199.
20. Beller M., Bornscheuer U.T. CO₂ fixation through hydrogenation by chemical or enzymatic methods // Angewandte Chemie International Edition. – 2014. – V. 53. – P. 4527–4528.
21. Bengelsdorf F. R., Beck M. H., Erz C., Hoffmeister S., Karl M. M., Riegler P., Wirth S., Poehlein A., Weuster-Botz D., Dürre P. Bacterial anaerobic synthesis gas (syngas) and CO₂+H₂ fermentation // Adv. Appl. Microbiol. – 2018. – V. 103. – P. 143–221.
22. Bertelli C., Laird M.R., Williams K.P., Simon Fraser University Research Computing Group, Lau B.Y., Hoad G., Winsor G.L., Brinkman F.S.L. IslandViewer 4: expended prediction of genomic islands for larger-scale datasets // Nucleic Acids Res. – 2017. – V. 45. – W30–W35.
23. Bertsch J., Müller V. Bioenergetic constraints for conversion of syngas to biofuels in acetogenic bacteria // Biotechnol Biofuels. – 2015a. – V. 8. – P. 210.
24. Bertsch J., Müller V. CO metabolism in the acetogen *Acetobacterium woodii* // Applied and Environmental Microbiology. – 2015b. – V. 81. – №17. – P. 5949–5956.
25. Bertsch J., Öppinger C., Hess V., Langer J.D., Müller V. Heterotrimeric NADH-oxidizing methylenetetrahydrofolate reductase from the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii* // J Bacteriol. – 2015a. – V. 197. – № 9. – P.1681–1689.
26. Bertsch J., Siemund A. L., Kremp F., Müller V. A novel route for ethanol oxidation in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*: the acetaldehyde/ethanol dehydrogenase pathway // Environmental Microbiology. – 2015b. – V. 18. – № 9. – P. 2913–2922.
27. Biegel E., Müller V. Bacterial Na⁺-translocating ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – V. 107. – P. 18138–18142.
28. Blamey J.M., Adams M.W. Purification and characterization of pyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* // Biochim Biophys Acta. – 1993. – V. 1161. – № 1. – P. 19–27.

29. Blin K., Shaw S., Steinke K., Villebro R., Ziemert N., Lee S.Y., Medema M.H., Weber T. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – V. 47. – W81–W87.
30. Böer T., Engelhardt L., Lüschen A., Eysell L., Yoshida H., Schneider D., Angenent L.T., Basen M., Daniel R., Poehlein A. Isolation and characterization of novel acetogenic *Moorella* strains for employment as potential thermophilic biocatalysts // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2024a. – V. 100. – № 9. – fae109.
31. Böer T., Schüler M.A., Lüschen A., Eysell L., Dröge J., Heinemann M., Engelhardt L., Basen M., Daniel R., Poehlein A. Isolation and characterization of novel acetogenic strains of the genera *Terrisporobacter* and *Acetoanaerobium* // *Front. Microbiol.* – 2024b. – V. 15. – 1426882.
32. Brandon N. P., Kurban Z. Clean energy and the hydrogen economy // *Philosophical Transactions of the Royal Society A.* – 2017. – V. 375. – 20160400.
33. Brandt K., Müller V. Hybrid rotors in F1F(o) ATP synthases: subunit composition, distribution, and physiological significance // *Biological Chemistry.* – 2015. – V. 396. – P. 1031–1042.
34. Braun M., Schoberth S., Gottschalk G. Enumeration of bacteria forming acetate from H₂ and CO₂ in anaerobic habitats // *Arch Microbiol.* – 1979. – V. 120. – № 3. – P. 201–204.
35. 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. 3rd, 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 // *Sci Rep.* – 2015. – V. 10. – № 5. – P. 8365.
36. Breznak J.A., Switzer J.M., Seitz, H.J. *Sporomusa termitida* sp. nov., an H₂/CO₂-utilizing acetogen isolated from termites // *Arch. Microbiol.* – 1988. – V. 150. – P. 282–288.
37. Buckel W., Thauer R. K. Flavin-based electron bifurcation, a new mechanism of biological energy coupling // *Chemical Reviews.* – 2018. – V. 118. – P. 3862–3886.

38. Capella-Gutiérrez S., Silla-Martínez J.M., Gabaldón T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses // *Bioinformatics*. – 2009. – V. 25. – № 15. – P.1972–1973.
39. Carlson E. D., Papoutsakis E. T. Heterologous expression of the *Clostridium carboxidivorans* CO dehydrogenase alone or together with the acetyl coenzyme A synthase enables both reduction of CO₂ and oxidation of CO by *Clostridium acetobutylicum* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2017. – V. 83. – e00829-e917.
40. Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis // *Mol. Biol. Evol.* – 2000. – V. 17. – P. 540–552.
41. Chadwick G.L., Hemp J., Fischer W.W., Orphan V.J. Convergent evolution of unusual complex I homologs with increased proton pumping capacity: energetic and ecological implications // *ISME J.* – 2018. – V. 12. – № 11. – P. 2668–2680.
42. Chaikitkaew S., In-chan S., Singkhala A., Tukanghan W., Mamimin C., Reungsang A., Birkeland N.K., O-Thong S. *Clostridium thailandense* sp. nov., a novel CO₂-reducing acetogenic bacterium isolated from peatland soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2022. – V. 72. – 005254.
43. Chaumeil P. A., Mussig A. J., Hugenholtz P., Parks D. H. GTDB-Tk v2: memory friendly classification with the genome taxonomy database // *Bioinformatics (Oxford, England)*. – 2022. – V. 38. – № 23. – P. 5315–5316.
44. Chen I.A., Markowitz V.M., Chu K., Palaniappan K., Szeto E., Pillay M., Ratner A., Huang J., Andersen E., Huntemann M., Varghese N., Hadjithomas M., Tennessen K., Nielsen T., Ivanova N.N., Kyrpides N.C. IMG/M: integrated genome and metagenome comparative data analysis system // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45. – D507–D516.
45. Chin K.J., Conrad R. Intermediary metabolism in methanogenic paddy soil and the influence of temperature // *FEMS Microbiol Ecol.* – 1995. – V. 18. – P. 85–102.
46. Clark J.E., Ljungdahl L.G. Purification and properties of 5,10-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase // *J. Biol. Chem.* – 1982. – V. 257. – P. 3833–3836.

47. Collins M. D., Lawson P. A., Willems A., Cordoba J.J., Fernandez-Garayzabal J., Garcia P., Cai J., Hippe H., Farrow J. A. E. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1994. – V. 44. – №4. – P. 812–826.
48. Colman D.R., Kraus E.A., Thieringer P.H., Rempfert K., Templeton A.S., Spear J.R., Boyd E.S. Deep-branching acetogens in serpentinized subsurface fluids of Oman // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2022. – V. 119. – № 42. – e2206845119.
49. Conrad R. Complexity of temperature dependence in methanogenic microbial environments // Front. Microbiol. – 2023. – V. 14. – 1232946.
50. Conrad R., Wetter B. Influence of temperature on energetics of hydrogen metabolism in homoacetogenic, methanogenic, and other anaerobic bacteria // Arch. Microbiol. – 1990. – V. 155. – P. 94–98.
51. Csurös M. Count: evolutionary analysis of phylogenetic profiles with parsimony and likelihood // Bioinformatics. – 2010. – V. 26. – P. 1910–1912.
52. Daniel S.L., Keith E.S., Yang H., Lin Y.S., Drake H.L. Utilization of methoxylated aromatic compounds by the acetogen *Clostridium thermoaceticum*: expression and specificity of the co-dependent O-demethylating activity // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1991. – V. 180. – P. 416–422.
53. Das A., Fu Z.Q., Tempel W., Liu Z.J., Chang J., Chen L., Lee D., Zhou W., Xu H., Shaw N., Rose J.P., Ljungdahl L.G., Wang B.C. Characterization of a corrinoid protein involved in the C1 metabolism of strict anaerobic bacterium *Moorella thermoacetica* // Proteins. – 2007. – V. 67. – № 1. – P. 167–176.
54. Das A., Hugenholtz J., van Halbeek H., Ljungdahl L.G. Structure and function of a menaquinone involved in electron transport in membranes of *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum* // J Bacteriol. – 1989. – V. 171. – P. 5823–5829.
55. Das A., Silaghi-Dumitrescu R., Ljungdahl L.G., Kurtz D.M. Jr. Cytochrome *bd* oxidase, oxidative stress, and dioxygen tolerance of the strictly anaerobic bacterium *Moorella thermoacetica* // J Bacteriol. – 2005. – V. 187. – P. 2020–2029.

56. Diender M., Stams A.J.M., Sousa D.Z. Production of medium-chain fatty acids and higher alcohols by a synthetic co-culture grown on carbon monoxide or syngas // *Biotechnol. Biofuels.* – 2016. – V. 9. – P. 82.
57. Diender, M., Parera Olm, I., Gelderloos, M., Koehorst, J.J., Schaap, P.J., Stams, A.J.M., Sousa D.Z. Metabolic shift induced by synthetic co-cultivation promotes high yield of chain elongated acids from syngas // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 9. – P. 18081.
58. Dobrindt U., Blaut M. Purification and characterization of a membrane-bound hydrogenase from *Sporomusa sphaeroides* involved in energy-transducing electron transport // *Arch Micro biol.* – 1996. – V. 165. – P. 141–147.
59. Drake H.L., Gößner A.S., Daniel S.L. Old acetogens, new light // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – V. 1125. – P. 100–128.
60. Eichler B., Schink B. Oxidation of primary aliphatic alcohols by *Acetobacterium carbinolicum* sp. nov., a homoacetogenic anaerobe // *Arch. Microbiol.* – 1984. – V. 140. – P. 147.
61. Emerson D.F., Woolston B.M., Liu N., Donnelly M., Currie D.H., Stephanopoulos G. Enhancing hydrogen-dependent growth of and carbon dioxide fixation by *Clostridium ljungdahlii* through nitrate supplementation // *Biotechnology and Bioengineering.* – 2019. – V.116. – P. 294–306.
62. Eppinger J., Huang K.W. Formic acid as a hydrogen energy carrier // *ACS Energy Lett.* – 2017. – V. 2. – P. 188–195.
63. Evans P.N., Parks D.H., Chadwick G.L., Robbins S.J. Orphan V.J., Golding S.D., Tyson G.W. Methane metabolism in the archaeal phylum *Bathyarchaeota* revealed by genome-centric metagenomics // *Science.* – 2015. – V. 350. – № 6259. – P. 434–438.
64. Ewens S.D., Gomberg A.F.S., Barnum T.P., Borton M.A., Carlson H.K., Wrighton K.C., Coates J.D. The diversity and evolution of microbial dissimilatory phosphite oxidation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2021. – V. 118. – № 11. – e2020024118.
65. Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome.* – 2014. – V. 2. – P. 6.

66. Falke D., Schulz K., Doberenz C., Beyer L., Lilie H., Thiemer B., Sawers R.G. Unexpected oligomeric structure of the FocA formate channel of *Escherichia coli*: a paradigm for the formate-nitrite transporter family of integral membrane proteins // FEMS Microbiol. Lett. – 2010. – 30369–30375.
67. Fan Y-X., Zhang J.-Z., Zhang Q., Ma X.-Q., Liu Z.-Y., Lu M., Qiao K., Li F.-L. Biofuel and chemical production from carbon one industry flux gas by acetogenic bacteria // Adv. Appl. Microbiol. – 2021. – V. 177. – P. 1–34.
68. Fardeau M.-L., Ollivier B., Cayol J. “Caldanaerobacter,” // In: Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (Ed. Whitman W.B.). – Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 2015.
69. Fernández-Blanco C., Veiga M.C., Kennes C. Efficient production of n-caproate from syngas by a co-culture of *Clostridium aceticum* and *Clostridium kluyveri* // J. Environ. Managem. – 2022. – V. 302. – 113992.
70. Filimonova E., Lavrushin V., Kharitonova N., Sartykov A., Maximova E., Baranovskaya E., Korzun A., Maslov A., Baidariko E. Hydrogeology and hydrogeochemistry of mineral sparkling groundwater within Essentuki area (Caucasian mineral water region) // Environ. Earth Sci. – 2020. – V. 79. – P. 15.
71. Fischer F., Lieske R., Winzer K. Biologische Gasreaktionen. II. Mitteilung: Über Die Bildung von Essigsäure bei der biologischen Umsetzung von Kohlenoxyd mit Wasserstoff zu Methan // Biochem. Z. – 1932. – V. 245. – P. 1–12.
72. Fontaine F.E., Peterson W.H., McCoy E., Johnson M.J. A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum* n. sp. // Journal of Bacteriology. – 1942. – V. 43. – P. 701–715.
73. Frey B., Rime T., Phillips M., Stierli B., Hajdas I., Widmer F., Hartmann M. Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers // FEMS Microbiol. Ecol. – 2016. – V. 92. – fiw018.
74. 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 // Front. Microbiol. – 2023. – V. 14. – 1185739.

75. Fröstl J.M., Seifritz C., Drake H.L. Effect of nitrate on the autotrophic metabolism of the acetogens *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum* // J Bacteriol. – 1996. – V. 178. – P. 4597–4603.
76. Fu B., Jin X., Conrad R., Liu H., Liu H. Competition between chemolithotrophic acetogenesis and hydrogenotrophic methanogenesis for exogenous H₂/CO₂ in anaerobically digested sludge: impact of temperature // Front. Microbiol. – 2019. – V. 10. – P. 2418.
77. Fu L., Song T., Lu Y. Snapshot of methanogen sensitivity to temperature in Zoige wetland from tibetan plateau // Front. Microbiol. – 2015. – V. 6. – P. 131.
78. Galani A., Venancius M.A., Tumulero B., Sipkema D., Sousa D.Z. Revisiting carbon monoxide metabolism in the *Moorella* genus and isolation of a novel *Moorella* species // Syst. Appl. Microbiol. – 2025. – V. 48. – № 4. – 126628.
79. Glissman K., Chin K.J., Casper P., Conrad R. Methanogenic pathway and archaeal community structure in the sediment of eutrophic Lake Dagow: effect of temperature // Microb Ecol. – 2004. – V. 48. – № 3. – P. 389–399.
80. Goessner A.S., Kuesel K., Devereux R., Drake H.L. Occurrence of thermophilic acetogens in Egyptian soils // Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. for Microbiol. – 1998. – Abstract N-1. – P. 366.
81. Gohl D.M., MacLean A., Hauge A., Becker A., Walek D., Beckman K.B. An optimized protocol for high- throughput amplicon-based microbiome profiling // Protoc. Exch. – 2016.
82. Gößner A., Drake H.L. Characterization of a new thermophilic acetogen (PT-1) isolated from aggregated Kansas prairie soil // Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. – 1997. – Abstr. N-122. – P. 401.
83. Gößner A.S., Devereux R., Ohnemüller N., Acker G., Stackebrandt E., Drake H.L. *Thermicanus aegyptius* gen. nov., sp. nov., isolated from oxic soil, a fermentative microaerophile that grows commensally with the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica* // Appl Environ Microbiol. – 1999. – V. 65. – № 11. – P. 5124–5133.

84. Gößner A.S., Küsel K., Schulz D., Trenz S., Acker G., Lovell C.R., Drake H.L. Trophic interaction of the aerotolerant anaerobe *Clostridium intestinale* and the acetogen *Sporomusa rhizae* sp. nov. isolated from roots of the black needlerush *Juncus roemerianus* // Microbiology (Reading). – 2006. – V. 152 (Pt 4). – P. 1209–1219.
85. Gottwald M., Andreesen J.R., LeGall J., Ljungdahl L.G. Presence of cytochrome and menaquinone in *Clostridium formicoaceticum* and *Clostridium thermoaceticum* // J Bacteriol. – 1975. – V. 122. – № 1. – P. 325–328.
86. Gtari M., Ventura S. Proposal of *Neomoorella* gen. nov. as a replacement name for the illegitimate prokaryotic genus name *Moorella* Collins et al. 1994. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2025. – V. 75. – № 5. – 006779.
87. Hagemeyer C.H., Krer M., Thauer R.K., Warkentin E., Ermler U. Insight into the mechanism of biological methanol activation based on the crystal structure of the methanol-cobalamin methyltransferase complex // Proc Natl Acad Sci USA. – 2006. – V. 103. – № 50. – P. 18917–18922.
88. Hattori S., Kamagata Y., Hanada S., Shoun H. *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2000. – V. 50. – P. 1601–1609.
89. He Y., Li M., Perumal V., Feng X., Xie J., Sievert S., Wang F. Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum *Bathyarchaeota* widespread in marine sediments // Nature Microbiology. – 2016. – V. 1. – № 6. – P. 16035.
90. Heider J., Ma K., Adams M.W. Purification, characterization, and metabolic function of tungsten-containing aldehyde ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic and proteolytic archaeon *Thermococcus* strain ES-1 // J Bacteriol. – 1995. – V. 177. – № 16. – P. 4757–4764.
91. Henstra A. M., Dijkema C., Stams A. J. *Archaeoglobus fulgidus* couples CO oxidation to sulfate reduction and acetogenesis with transient formate accumulation // Environmental Microbiology. – 2007. – V. 9. – P. 1836–1841.

92. Herzog J., Mook A., Utesch T., Bengelsdorf F.R., Zeng A.-P. Lactate based caproate production with *Clostridium drakei* and process control of *Acetobacterium woodii* via lactate dependent in situ electrolysis // Front. Bioeng. Biotechnol. – 2023. – V. 11. – 1212044.
93. Hess V., Oyrik O., Trifunovic D., Müller V. 2,3-butanediol metabolism in the acetogen *Acetobacterium woodii* // Applied and Environmental Microbiology. – 2015. – V. 81. – P. 4711–4719.
94. Hess V., Poehlein A., Weghoff M. C., Daniel R., Müller V. A genome-guided analysis of energy conservation in the thermophilic, cytochrome-free acetogenic bacterium *Thermoanaerobacter kivui* // BMC Genomics. – 2014. – V. 15. – P. 1139.
95. Hess V., Schuchmann K., Müller V. The ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase (Rnf) from the acetogen *Acetobacterium woodii* requires Na⁺ and is reversibly coupled to the membrane potential // J Biol Chem. – 2013. – V. 288. – № 44. – P. 31496–31502.
96. Hocq R., Horvath J., Stumptner M., Malevičius M., Thallinger G.G., Pflügl S. A megatransposon drives the adaptation of *Thermoanaerobacter kivui* to carbon monoxide // Nat Commun. – 2025. – V. 16. – № 1. – P. 4217.
97. Hugenholtz J., Ljungdahl L.G. Metabolism and energy generation in homoacetogenic clostridia // FEMS Microbiol Rev. – 1990. – V. 7. – № 3–4. – P. 383–389.
98. Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson A.F. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies // Appl. Environ. Microbiol. – 2014. – V. 80. – №. 16. – P. 5116–5123.
99. Imran S.M.S., Wiley S.A., Lubner C.E. Electrochemistry of flavin-based electron bifurcation: ‘Current’ past and ‘potential’ futures // Curr. Opin. Electrochem. – 2024. – V. 47. – 101536.
100. Jain S., Katsyv A., Basen M., Müller V. The monofunctional CO dehydrogenase CooS is essential for growth of *Thermoanaerobacter kivui* on carbon monoxide // Extremophiles. – 2021. – V. 26. – P. 4.

101. Jeletic M.S., Mock M.T., Appel A.M., Linehan J.C. A cobalt-based catalyst for the hydrogenation of CO₂ under ambient conditions // Journal of the American Chemical Society. – 2013. – V. 135. – P. 11533–11536.
102. Jeon W.B., Cheng J., Ludden P.W. Purification and characterization of membrane-associated CooC protein and its functional role in the insertion of nickel into carbon monoxide dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* // Journal of Biological Chemistry. – 2001. – V. 42. – P. 38602–38609.
103. Jiang B., Henstra A.-M., Paulo P.L., Balk M., van Doesburg W., Stams A.J.M. Atypical one-carbon metabolism of an acetogenic and hydrogenogenic *Moorella thermoacetica* strain // Arch. Microbiol. – 2009. – V. 191. – P. 123–131.
104. Kamlage B., Blaut M. Isolation of a cytochrome-deficient mutant strain of *Sporomusa sphaeroides* not capable of oxidizing methyl groups // J Bacteriol. – 1993. – V. 175. – № 10. – P. 3043–3050.
105. Kane M.D., Breznak J.A. *Acetonema longum* gen. nov. sp. nov., an H₂/CO₂ acetogenic bacterium from the termite, *Pterotermes occidentis* // Arch. Microbiol. – 1991. – V. 156. – P. 91–98.
106. Karita S., Nakayama K., Goto M., Sakka K., Kim W.J., Ogawa S. A novel cellulolytic, anaerobic, and thermophilic bacterium, *Moorella* sp. strain F21 // Biosci Biotechnol Biochem. – 2003. – V. 67. – № 1. – P. 183–185.
107. Karnholz A., Küsel K., Goner A., Schramm A., Drake H.L. Tolerance and metabolic response of acetogenic bacteria toward oxygen // Appl Environ Microbiol. – 2002. – V. 68. – P. 1005–1009.
108. Kato S., Yumoto I., Kamagata Y. Isolation of acetogenic bacteria that induce biocorrosion by utilizing metallic iron as the sole electron donor // Appl Environ Microbiol. – 2015. – V. 81. – № 1. – P. 67–73.
109. Katsyv A., Kumar A., Saura P., Pöverlein M.C., Freibert S.A., Stripp S.T., Jain S., Gamiz-Hernandez A.P., Kaila V.R.I., Müller V., Schuller J.M. Molecular basis of the electron bifurcation mechanism in the [FeFe]-hydrogenase complex HydABC // J Am Chem Soc. – 2023. – V. 145. – № 10. – P. 5696–5709.

110. Katsyv A., Müller V. Overcoming energetic barriers in acetogenic C1 conversion // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – V. 8. – 621166.
111. Kaufmann F., Wohlfarth G., Diekert G. Isolation of O-demethylase, an ether-cleaving enzyme system of the homoacetogenic strain MC // *Arch Microbiol.* – 1997. – V. 168. – № 2. – P. 136–142.
112. Kawasaki S., Sakai Y., Takahashi T., Suzuki I., Niimura Y. O₂ and reactive oxygen species detoxification complex, composed of O₂-responsive NADH:rubredoxin oxidoreductase-flavoprotein A2-desulfoferrodoxin operon enzymes, rubperoxin, and rubredoxin, in *Clostridium acetobutylicum* // *Appl Environ Microbiol.* – 2009. – V. 75. – P. 1021–1029.
113. Keller A., Schink B., Müller N. Energy-conserving enzyme systems active during syntrophic acetate oxidation in the thermophilic bacterium *Thermacetogenium phaeum* // *Front Microbiol.* – 2019. – V. 10. – P. 2785.
114. Khomyakova M.A., Merkel A.Y., Petrova D.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Alkalibaculum sporogenes* sp. nov., isolated from a terrestrial mud volcano and emended description of the genus *Alkalibaculum* // *Int. J. syst. Evol. Microbiol.* – 2020. – V. 70. – P. 4914–4919.
115. Kim B.C., Grote R., Lee D.W., Antranikian G., Pyun Y.R. *Thermoanaerobacter yonseiensis* sp. nov., a novel extremely thermophilic, xylose-utilizing bacterium that grows at up to 85 degrees C // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2001. – V. 51. – P. 1539–1548.
116. Kochetkova T.V., Podosokorskaya O.A., Elcheninov A.G., Kublanov I.V., Diversity of thermophilic prokaryotes inhabiting Russian natural hot springs // *Microbiology.* – 2022. – V. 91. – P. 1–27.
117. Köpke M., Held C., Hujer S., Liesegang H., Wiezer A., Wollherr A., Ehrenreich A., Liebl W., Gottschalk G., Dürre P. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – V. 107. – P. 13087–13092.

118. Koren S., Walenz B. P., Berlin K., Miller J. R., Bergman N. H., Phillippy A. M. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation // *Genome Research*. – 2017. – V. 27. – № 5. – P. 722–736.
119. Kozina I.V., Kublanov I.V., Kolganova T.V., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Caldanaerobacter uzonensis* sp. nov., an anaerobic, thermophilic, heterotrophic bacterium isolated from a hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2010. – V. 60. – P. 1372–1375.
120. Kreft J.U., Schink B. O-demethylation by the homoacetogenic anaerobe *Holophaga foetida* studied by a new photometric methylation assay using electrochemically produced cob(I)alamin // *Eur J Biochem.* – 1994. – V. 226. – № 3. – P. 945–951.
121. Kremp F., Roth J., Müller V. A Third Way of Energy conservation in acetogenic bacteria // *Microbiol Spectr.* – 2022. – V. 10. – № 4. – e0138522.
122. Kremp F., Roth J., Müller V. The *Sporomusa* type Nfn is a novel type of electron - bifurcating transhydrogenase that links the redox pools in acetogenic bacteria // *Sci. Rep.* – 2020. – V. 10. – P. 14872.
123. Kröger A., Biel S., Simon J., Gross R., Unden G., Lancaster C.R. Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism // *Biochim Biophys Acta.* – 2002. – V. 1553. – P. 23–38.
124. Krumholz L.R., Harris S.H., Tay S.T., Suflita J.M. Characterization of two subsurface H₂-utilizing bacteria, *Desulfomicrobium hypogeium* sp. nov. and *Acetobacterium psammolithicum* sp. nov., and their ecological roles // *Appl Environ Microbiol.* – 1999. – V. 65. – P. 2300–2306.
125. Kuhner C.H., Frank C., Griesshammer A., Schmittroth M., Acker G., Gössner A., Drake H.L. *Sporomusa silvacetica* sp. nov., an acetogenic bacterium isolated from aggregated forest soil // *Int J Syst Bacteriol.* – 1997. – V. 47. – № 2. – P. 352–358.
126. Kuhns, M., Trifunović, D., Huber, H., Müller V. The Rnf complex is a Na⁺ coupled respiratory enzyme in a fermenting bacterium, *Thermotoga maritima* // *Commun Biol.* – 2020. – V. 3. – P. 431.

127. Küsel K., Dorsch T., Acker G., Stackebrandt E., Drake H.L. *Clostridium scatologenes* strain SL1 isolated as an acetogenic bacterium from acidic sediments // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2000. – V. 50. – P. 537–546.
128. Küsel K., Drake H.L. Effects of environmental parameters on the formation and turnover of acetate by forest soils // Appl Environ Microbiol. – 1995. – V. 61. – № 10. – P. 3667–3675.
129. Küsel K., Karnholz A., Trinkwalter T., Devereux R., Acker G., Drake H.L. Physiological ecology of *Clostridium glycolicum* RD-1, an aerotolerant acetogen isolated from sea grass roots // Appl Environ Microbiol. – 2001. – V. 67. – № 10. – P. 4734–4741.
130. Latif H., Zeidan A.A., Nielsen A.T., Zengler K. Trash to treasure: production of biofuels and commodity chemicals via syngas fermenting microorganisms // Curr Opin Biotechnol. – 2014. – V. 27. – P. 79–87.
131. Lauer I., Philipps G., Jennewein S. Metabolic engineering of *Clostridium ljungdahlii* for the production of hexanol and butanol from CO₂ and H₂ // Microb. Cell Fact. – 2022. – V. 21. – P. 85.
132. Laura M., Jo P. No acetogen is equal: strongly different H₂ thresholds reflect diverse bioenergetics in acetogenic bacteria // Environmental Microbiology. – 2023. – V. 25. – № 10. – P. 2032–2040.
133. Leadbetter J.R., Schmidt T.M., Graber J.R., Breznak J.A. Acetogenesis from H₂ plus CO₂ by spirochetes from termite guts // Science. – 1999. – V. 283. – P. 686–689.
134. Lee M. J., Zinder S. H. Isolation and characterization of a thermophilic bacterium which oxidizes acetate in syntrophic association with a methanogen and which grows acetogenically on H₂-CO₂ // Applied and Environmental Microbiology. – 1988. – V. 54. – №1. – P. 124–129.
135. Lessner D.J., Li L., Li Q., Rejtar T., Andreev V.P., Reichlen M., Hill K., Moran J.J., Karger B.L., Ferry J.G. An unconventional pathway for reduction of CO₂ to methane in CO-grown *Methanosarcina acetivorans* revealed by proteomics // Proc Natl Acad Sci USA. – 2006. – V. 103. – № 47. – P. 17921–17926.

136. Lever M.A. Acetogenesis in the energy-starved deep biosphere – a paradox? // *Front. Microbiol.* – 2011. – V. 2. – P. 284.
137. Liang J., Huang H., Wang Y., Li L., Yi J., Wang S. A Cytoplasmic NAD(P)H-dependent polysulfide reductase with thiosulfate reductase activity from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* // *Microbiol Spectr.* – 2022. – V. 10. – № 4. – e0043622.
138. Liou J.S.-C., Balkwill D.L., Drake G.R., Tanner R.S. *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2005. – V. 55. – P. 2085–2091.
139. Liu S., Suflita J.M. H₂/CO₂-dependent anaerobic O-demethylation activity in subsurface sediments and by an isolated bacterium // *Appl Environ Microbiol.* – 1993. – V. 59. – № 5. – P. 1325–1331.
140. Ljungdahl L.G. The acetyl-CoA pathway and the chemiosmotic generation of ATP during acetogenesis // In: *Acetogenesis* (Ed. Drake H.L.). Chapman and Hall Microbiology Series. – Boston, USA: Springer, 1994. – P. 63–87.
141. Ljungdahl L.G. The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria // *Annual Review of Microbiology.* – 1986. – V. 40. – P. 415–450.
142. Ljungdahl L.G., Wood H.G. Total synthesis of acetate from CO₂ by heterotrophic bacteria // *Annual Review of Microbiology.* – 1969. – V. 23. – № 1. – P. 515–538.
143. Loman N., Quick J., Simpson J. A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data // *Nature Methods.* – 2015. – V. 12. – P. 733–735.
144. López G., Cañas-Duarte S.J., Pinzón-Velasco A.M., Vega-Vela N.E., Rodríguez M., Restrepo S., Baena S. Description of a new anaerobic thermophilic bacterium, *Thermoanaerobacterium butyriciformans* sp. nov. // *Syst Appl Microbiol.* – 2017. – V. 40. – № 2. – P. 86–91.

145. Lv X., Yu W., Zhang C., Ning P., Li J., Liu Y., Du G., Liu L. C1-based biomanufacturing: Advances, challenges and perspectives // *Bioresour. Technol.* – 2023. – V. 367. – P. 128259.
146. MacKenzie R.E. Biogenesis and interconversion of substituted tetrahydrofolates // In: *Folates and pterins* (Eds: Blakley R.L., Benkovic S.J.). – New York, USA: John Wiley & Sons, Inc., 1984. – P. 256–306.
147. Majillano M.R., Jahansou H., Matsunaga T.O., Kenyon G.L., Himes R.H. Formation and utilization of formyl phosphate by N10-formyltetrahydrofolate synthetase: Evidence for formyl phosphate as an intermediate in the reaction // *Biochem.* – 1989. – V. 28. – P. 5136–5145.
148. Mao Z., Fleming J.R., Mayans O., Frey J., Schleheck D., Schink B., Müller N. AMP-dependent phosphite dehydrogenase, a phosphorylating enzyme in dissimilatory phosphite oxidation // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2023. – V. 120. – № 45. – e2309743120.
149. Mao Z., Gräßle F., Frey J., Franchini P., Schleheck D., Müller N., Schink B. *Phosphitispora fastidiosa* gen. nov. sp. nov., a new dissimilatory phosphite-oxidizing anaerobic bacterium isolated from anaerobic sewage sludge // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2021. – V. 71. – P. 12.
150. Matthies C., Freiburger A., Drake H.L. Fumarate dissimilation and differential reductant flow by *Clostridium formicoaceticum* and *Clostridium aceticum* // *Arch. Microbiol.* – 1993. – V. 160. – P. 273–278.
151. Matthies D., Zhou W., Klyszejko A. L., Anselmi C., Yildiz O., Brandt K., Müller V., Faraldo-Gómez J. D., Meier T. High-resolution structure and mechanism of an F/V hybrid rotor ring in a Na⁺-coupled ATP synthase // *Nature Communications.* – 2014. – V. 5. – P. 5286.
152. Mayer F., Lim J.K., Langer J.D., Kang S.G., Müller V. Na⁺ transport by the A₁A₀-ATP synthase purified from *Thermococcus onnurineus* and reconstituted into liposomes // *Journal of Biological Chemistry.* – 2015. – V. 290. – P. 6994–7002.
153. McInerney M. J., Bryant M. P. Basic principles of bioconversions in anaerobic digestion and methanogenesis // In: *Biomass Conversion Processes for Energy*

and Fuels (Eds. Sofer S. S., Zaborsky O. R). – Boston, USA: Springer, 1981. – P. 277–296.

154. Meier T., Ferguson S. A., Cook G. M., Dimroth P., Vonck J. Structural investigations of the membrane-embedded rotor ring of the F-ATPase from *Clostridium paradoxum* // Journal of Bacteriology. – 2006. – V. 188. – P. 7759–7764.

155. Meier T., Krah A., Bond P. J., Pogoryelov D., Diederichs K., Faraldo-Gómez J. D. Complete ion-coordination structure in the rotor ring of Na⁺-dependent F-ATP synthases // Journal of Molecular Biology. – 2009. – V. 391. – P. 498–507.

156. Menon S., Ragsdale S.W. The role of an iron-sulfur cluster in an enzymatic methylation reaction: methylation of CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase by the methylated corrinoid iron-sulfur protein // J. Biol. Chem. – 1999. – V. 274. – P. 11513–11518.

157. Merkel A.Y., Tarnovetskii I.Y., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // Microbiology. – 2019. – V. 88. – P. 671–680.

158. Misra H.P., Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins // J. Biol. Chem. – 1971. – V. 246. – P. 6886–6890.

159. Mock J., Wang S., Huang H., Kahnt J., Thauer R.K. Evidence for a hexaheteromeric methylenetetrahydrofolate reductase in *Moorella thermoacetica* // J Bacteriol. – 2014. – V. 196. – № 18. – P. 3303–3314.

160. Moon J., Dönig J., Kramer S., Poehlein A., Daniel R., Müller V. Formate metabolism in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii* // Environ. Microbiol. – 2021. – V. 23. – P. 4214–4227.

161. Moon J., Poehlein A., Daniel R., Müller V. Redirecting electron flow in *Acetobacterium woodii* enables growth on CO and improves growth on formate // Nat Commun. – 2024. – V. 15. – P. 5424.

162. Moore M.R., O'Brien W.E., Ljungdahl L.G. Purification and characterization of nicotinamide adenine dinucleotide-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase from *Clostridium formicoaceticum* // Journal of Biological Chemistry. – 1974. – V. 249. – P. 5250–5253.

163. Mori K., Hanada S., Maruyama A., Marumo K. *Thermanaeromonas toyohensis* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic anaerobe isolated from a subterranean vein in the Toyoha Mines // Int J Syst Evol Microbiol. – 2002. – V. 52(Pt 5). – P. 1675–1680.
164. Mori T.A., Woodman R.J., Burke V., Puddey I.B., Croft K.D., Beilin L.J. Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers, in treated-hypertensive Type 2 diabetic subjects // Free Rad Biol Med. – 2003. – V. 35. – P. 772–781.
165. Müller V. New horizons in acetogenic conversion of one-carbon substrates and biological hydrogen storage // Trends Biotechnol. – 2019. – V. 37. – № 12. – P. 1344–1354.
166. Müller V., Chowdhury N.P., Basen M. Electron bifurcation: a long-hidden energy-coupling mechanism // Annu Rev Microbiol. – 2018. – V. 72. – P. 331–353.
167. Müller V., Grüber G. ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2003. – V. 60. – P. 474–494.
168. Nagara Y., Fujii D., Takada T., Sato-Yamazaki M., Odani T., Oishi K. Selective induction of human gut-associated acetogenic/butyrogenic microbiota based on specific microbial colonization of indigestible starch granules // ISME J. – 2022. – V. 16. – № 6. – P. 1502–1511.
169. Nepomnyashchaya Y.N., Slobodkina G.B., Baslerov R.V., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Netrusov A.I., Slobodkin A.I. *Moorella humiferrea* sp. nov., a thermophilic, anaerobic bacterium capable of growth via electron shuttling between humic acid and Fe(III) // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2012. – V. 62. – P. 613–617.
170. Nevin K.P., Hensley S.A., Franks A.E., Summers Z.M., Ou J., Woodard T.L., Snoeyenbos-West O.L., Lovley D.R. Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms // Appl Environ Microbiol. – 2011. – V. 77. – № 9. – P. 2882–2886.
171. Nevin K.P., Woodard T.L., Franks A.E., Summers Z.M., Lovley D.R. Microbial electrosynthesis: feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and

water to multicarbon extracellular organic compounds // *mBio*. – 2010. – V.1. – № 2. – e00103-10.

172. Novelli P.C., Masarie K.A., Tans P.P., Lang P.M. Recent changes in atmospheric carbon monoxide // *Science*. – 1994. – V. 263. – P. 1587–1590.

173. Nozhevnikova A.N., Holliger C., Ammann A., Zehnder A.J.B. Methanogenesis in sediments from deep lakes at different temperatures (12–70 °C) // *Water Sci. Technol.* – 1997. – V. 36. – P. 57–64.

174. Onyenwoke R.U., Wiegel J. “Thermoanaerobacterium” // In: *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (Ed. Whitman W.B.). – Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. – 2015.

175. Orsi E., Nikel P.I., Nielsen L.K., Donati S. Synergistic investigation of natural and synthetic C1-trophic microorganisms to foster a circular carbon economy // *Nat. Commun.* – 2023. – V. 14. – № 1. – P. 6673.

176. Orsi W.D., Vuillemin A., Rodriguez P., Coskun Ö.K., Gomez-Saez G. V., Lavik G., Morholz V., Ferdelman T.G. Metabolic activity analyses demonstrate that *Lokiarchaeon* exhibits homoacetogenesis in sulfidic marine sediments // *Nature Microbiology*. – 2020. – V. 5. – № 2. – P. 248–255.

177. Parks D.H., Chuvochina M., Chaumeil P.-A., Rinke C., Mussig A.J., Hugenholtz P. A complete domain-to-species taxonomy for bacteria and Archaea // *Nat. Biotechnol.* – 2020. – V. 38. – P. 1079–1086.

178. Parks D.H., Chuvochina M., Waite D.W., Rinke C., Skarshewski A., Chaumeil P.-A., Hugenholtz P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life // *Nat. Biotechnol.* – 2018. – V. 36. – P. 996–1004.

179. Pawelek P.D., Allaire M., Cygler M., MacKenzie R.E. Channeling efficiency in the bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase domain: the effects of site-directed mutagenesis of NADP binding residues // *Biochim Biophys Acta*. – 2000. – V. 1479. – P. 59–68.

180. Pelletier J.N., MacKenzie R.E. Binding and interconversion of tetrahydrofolates at a single site in the bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase // *Biochem.* – 1995. – V. 34. – P. 12673–12680.
181. Peters J.W., Miller A.F., Jones A.K., King P.W., Adams M.W. Electron bifurcation // *Curr Opin Chem Biol.* – 2016. – V. 31. – P. 146–152.
182. Peters V., Janssen P.H., Conrad R. Efficiency of hydrogen utilization during unitrophic and mixotrophic growth of *Acetobacterium woodii* on hydrogen and lactate in the chemostat // *FEMS Microbiology Ecology.* – 1998. – V. 26. – № 4. – P. 317–324.
183. Pfennig N. Anreicherungskulturen für rote und grün Schwefelbakterien // *Zb Bact Abt Orig Supplementheft.* – 1965. – V. 1. – P. 179–189.
184. Piché-Choquette S., Constant P. Molecular hydrogen, a neglected key driver of soil biogeochemical processes // *Appl Environ Microbiol.* – 2019. – V. 85. – № 6. – e02418–18.
185. Pikuta E.V., Hoover R.B., Bej A.K., Marsic D., Detkova E. N., Whitman W. B., Krader P. *Tindallia californiensis* sp. nov., a new anaerobic, haloalkaliphilic, spore-forming acetogen isolated from Mono Lake in California // *Extremophiles* – 2003. – V. 7. – P. 327–334.
186. Poehlein A., Daniel R., Schink B., Simeonova D.D. Life based on phosphite: a genome-guided analysis of *Desulfotignum phosphitoxidans* // *BMC Genomics.* – 2013. – V. 14. – № 1. – P. 753.
187. Poehlein A., Schmidt S., Kaster A. K., Goenrich M., Vollmers J., Thürmer A., Bertsch J., Schuchmann K., Voigt B., Hecker M., Daniel R., Thauer R. K., Gottschalk G., Müller V. An ancient pathway combining carbon dioxide fixation with the generation and utilization of a sodium ion gradient for ATP synthesis // *PloS one.* – 2012. – V. 7. – № 3. – e33439.
188. Poehlein A., Zeldes B., Flaiz M., Böer T., Lüschen A., Höfele F., Baur K.S., Molitor B., Kröly C., Wang M., Zhang Q., Fan Y., Chao W., Daniel R., Li F., Basen M., Müller V., Angenent L.T., Sousa D.Z., Bengelsdorf F.R. Advanced aspects of acetogens // *Bioresour Technol.* – 2025. – V. 427. – 131913.

189. Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus A., Korobeynikov A. Using SPAdes de novo assembler // Curr. Protoc. Bioinformatics. – 2020. – V. 70. – e102.
190. Ragsdale S. W. Pyruvate ferredoxin oxidoreductase and its radical intermediate // Chemical Reviews. – 2003. – V. 103. – P. 2333–2346.
191. Ragsdale S.W. Nickel containing CO dehydrogenases and hydrogenases // In: Enzyme-catalyzed electron and radical transfer (Eds. Holzenburg A., Scrutton N.S). Enzyme-Catalyzed Electron and Radical Transfer. – Boston: Springer, 2000. – V. 35. – P. 487–518.
192. Ragsdale S.W., Ljungdahl L.G. Purification and properties of NAD-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase from *Acetobacterium woodii* // Journal of Biological Chemistry. – 1984. – V. 259. – P. 3499–3503.
193. Ragsdale S.W., Pierce E. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl Pathway of CO₂ fixation // Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics. – 2008. – V. 1784. – №12. – P. 1873–1898.
194. Rich J.J., King G.M. Carbon monoxide oxidation by bacteria associated with the roots of freshwater macrophytes // Appl Environ Microbiol. – 1998. – V. 64. – № 12. – P. 4939–4943.
195. Richardson Y., Blin J., Julbe A. A short overview on purification and conditioning of syngas produced by biomass gasification: catalytic strategies, process intensification and new concepts // Progress in Energy and Combustion Science. – 2012. – V. 38. – P. 765–781.
196. Richter H., Molitor B., Wei H., Chen W., Aristilde L., Angenent L.T. Ethanol production in syngas-fermenting *Clostridium ljungdahlii* is controlled by thermodynamics rather than by enzyme expression // Energy Environ. Sci. – 2016. – V. 9. – P. 2392–2399.
197. Rieu-Lesme F., Dauga C., Fonty G., Dore J. Isolation from the rumen of a new acetogenic bacterium phylogenetically closely related to *Clostridium difficile* // Anaerobe. – 1998. – V. 4. – № 2. – P. 89–94.
198. Roberts D.L., James-Hagstrom J.E., Garvin D.K., Gorst C.M., Runquist J.A., Baur J.R., Haase F.C., Ragsdale S.W. Cloning and expression of the gene cluster

encoding key proteins involved in acetyl-CoA synthesis in *Clostridium thermoaceticum*: CO dehydrogenase, the corrinoid/FeS protein, and methyltransferase // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1989. – V. 86. – P. 32–36.

199. Roels J., Verstraete W. Biological formation of volatile phosphorus compounds // Bioresour Technol. – 2001. – V. 79. – P. 243–250.

200. Romano I., Dipasquale L., Orlando P., Lama L., d'Ippolito G., Pascual J., Gambacorta A. *Thermoanaerobacterium thermostercus* sp. nov., a new anaerobic thermophilic hydrogen-producing bacterium from buffalo-dung // Extremophiles. – 2010. – V. 14. – № 2. – P. 233–240.

201. Rosenbaum F.P., Müller V. Energy conservation under extreme energy limitation: the role of cytochromes and quinones in acetogenic bacteria // Extremophiles. – 2021. – V. 25. – № 5-6. – P. 413–424.

202. Rosenbaum F.P., Poehlein A., Daniel R., Müller V. Energy-conserving dimethyl sulfoxide reduction in the acetogenic bacterium *Moorella thermoacetica* // Environmental Microbiology. – 2022. – V. 24. – P. 2000–2012.

203. Rother M., Metcalf W.W. Anaerobic growth of *Methanosarcina acetivorans* C2A on carbon monoxide: An unusual way of life for a methanogenic archaeon // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2004. – V. 101. – P. 16929–16934.

204. Scheid D., Stubner S., Conrad R. Effects of nitrate- and sulfate-amendment on the methanogenic populations in rice root incubations // FEMS Microbiology Ecology. – 2003. – V. 43. – № 3. – P. 309–315.

205. Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1997. – V. 61. – P. 262–280.

206. Schink B., Friedrich M. Phosphite oxidation by sulphate reduction // Nature. – 2000. – V. 406. – P. 37.

207. Schink B., Thiemann V., Laue H., Friedrich M.W. *Desulfotignum phosphitoxidans* sp. nov., a new marine sulfate reducer that oxidizes phosphite to phosphate // Arch Microbiol. – 2002. – V. 177. – № 5. – P. 381–391.

208. Schmehl M., Jahn A., zu Vilsendorf A. M., Hennecke S., Masepohl B., Schuppler M., Marxer M., Oelze J., Klipp W. Identification of a new class of nitrogen

fixation genes in *Rhodobacter capsulatus* – a putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase // Molecular and General Genetics. – 1993. – V. 241. – №5–6. – P. 602–615.

209. Schnürer A., Schink B., Svensson B. H. *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1996. – V. 46. – №4. – P. 1145–1152.

210. Schoelmerich M. C., Müller V. Energy conservation by a hydrogenase-dependent chemiosmotic mechanism in an ancient metabolic pathway // Proc Natl Acad Sci USA. – 2019. – V. 116. - № 13. – P. 6329–6334.

211. Schoelmerich M.C., Müller V. Energy-converting hydrogenases: the link between H₂ metabolism and energy conservation // Cell Mol Life Sci. – 2020. – V. 77. – № 8. – P. 1461–1481.

212. Schöne C., Poehlein A., Jehmlich N., Adlung N., Daniel R., von Bergen M., Scheller S., Rother M. Deconstructing *Methanosarcina acetivorans* into an acetogenic archaeon // Proc Natl Acad Sci USA. – 2022. – V. 119. – № 2. – e2113853119.

213. Schuchmann K., Chowdhury N.P., Müller V. Complex multimeric [FeFe] hydrogenases: Biochemistry, physiology and new opportunities for the hydrogen economy // Front. Microbiol. – 2018. – V. 9. – P. 2911.

214. Schuchmann K., Müller V. A bacterial electron bifurcating hydrogenase // Journal of Biological Chemistry. – 2012. – V. 287. – P. 31165–31171.

215. Schuchmann K., Müller V. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria // Nature Reviews Microbiology. – 2014. – V. 12. – P. 809–821.

216. Schuchmann K., Müller V. Direct and reversible hydrogenation of CO₂ to formate by a bacterial carbon dioxide reductase // Science. – 2013. – V. 342. – P. 1382–1385.

217. Schuchmann K., Müller V. Energetics and application of heterotrophy in acetogenic bacteria // Applied and Environmental Microbiology. – 2016. – V. 82. – № 14. – P. 4056–4069.

218. Schuchmann K., Schmidt S., Martinez Lopez A., Kaberline C., Kuhns M., Lorenzen W., Bode H. B., Joos F., Müller V. Nonacetogenic growth of the acetogen *Acetobacterium woodii* on 1,2-propanediol // Journal of Bacteriology. – 2015. – V. 197. – P. 382–391.
219. Schulz S., Conrad R. Influence of temperature on pathways to methane production in the permanently cold profundal sediment of Lake Constance // FEMS Microbiology Ecology. – 1996. – V. 20. – № 1. – P. 1–14.
220. Schwarz F., Ciurus S., Jain S., Baum C., Wiechmann A., Basen M., Müller V. Revealing formate production from carbon monoxide in wild type and mutants of Rnf- and Ech-containing acetogens, *Acetobacterium woodii* and *Thermoanaerobacter kivui* // Microbial Biotechnology. – 2020. – V. 13. - № 6. – P. 2044 – 2056.
221. Seravalli J., Kumar M., Ragsdale S.W. Rapid kinetic studies of acetyl-CoA synthesis: evidence supporting the catalytic intermediacy of a paramagnetic NiFeC species in the autotrophic Wood-Ljungdahl pathway // Biochem. – 2002. – V. 41 – P. 1807–1819.
222. Shang S., Qian L., Zhang X., Li K. *Thermoanaerobacterium calidifontis* sp. nov., a novel anaerobic, thermophilic, ethanol-producing bacterium from hot springs in China // Arch. Microbiol. – 2013. – V. 195. – P. 439–445.
223. Sharak Genthner B.R., Davies C.L., Bryant M.P. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H₂-CO₂-utilizing species // Appl. Environ. Microbiol. – 1981. – V. 42. – P. 12–19.
224. Silaghi-Dumitrescu R., Coulter E.D., Das A., Ljungdahl L.G., Jameson G.N.L., Huynh B.H., Kurtz D.M. A flavodiiron protein and high molecular weight rubredoxin from *Moorella thermoacetica* with nitric oxide reductase activity // Biochemistry. – 2003. – V. 42. – P. 2806–2815.
225. Simankova M.V., Kotsyurbenko O.R., Stackebrandt E., Kostrikina N.A., Lysenko A.M., Osipov G.A., Nozhevnikova A.N. *Acetobacterium tundrae* sp nov, a new psychrophilic acetogenic bacterium from tundra soil // Archives of microbiology. – 2000. – V. 174. – № 6. – P. 440–447.

226. Simeonova D.D., Wilson M.M., Metcalf W.W., Schink B. Identification and heterologous expression of genes involved in anaerobic dissimilatory phosphite oxidation by *Desulfotignum phosphitoxidans* // J Bacteriol. – 2010. – V. 192. – № 19. – P. 5237–5244.
227. Slobodkin A., Reysenbach A.L., Mayer F., Wiegel J. Isolation and characterization of the homoacetogenic thermophilic bacterium *Moorella glycerini* sp. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1997. – V. 47. – P. 969–974.
228. Slobodkina G.B., Merkel A.Y., Kuchierskaya A.A., Slobodkin A.I. *Moorella sulfireducens* sp. nov., a thermophilic anaerobic bacterium isolated from a terrestrial thermal spring // Extremophiles. – 2022. – V. 26. – P. 33.
229. Slobodkina G.B., Panteleeva A N., Kostrikina N.A., Kopitsyn D.S., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Tepidibacillus fermentans* gen. nov., sp. nov.: a moderately thermophilic anaerobic and microaerophilic bacterium from an underground gas storage // Extremophiles. – 2013. – P. 17833–17839.
230. Sorokin D.Y., Diender M., Merkel A.Y., Koenen, M., Bale, N.J., Pabst, M., Sinninghe Damsté J.S., Sousa D.Z. *Natranaerofaba carboxydovora* gen. nov., sp. nov., an extremely haloalkaliphilic CO utilizing acetogen from a hypersaline soda lake representing a novel deep phylogenetic lineage in the class ‘*Natranaerobiia*’ // Environ. Microbiol. – 2021. – V. 23. – P. 3460–3476.
231. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies // Bioinformatics. – 2014. – V. 30. – P. 1312–1313.
232. Stupperich E., Konle R. Corrinoid-dependent methyl transfer reactions are involved in methanol and 3,4-dimethoxybenzoate metabolism by *Sporomusa ovata* // Appl Environ Microbiol. – 1993. – V. 59. – № 9. – P. 3110–3116.
233. Suzuki S., Nealson K. H., Ishii S. Genomic and in-situ transcriptomic characterization of the Candidate Phylum NPL-UPL2 from highly alkaline highly reducing serpentinized groundwater // Frontiers in Microbiology. – 2018. – V. 9. – 3141.
234. Tanner R.S., Miller L.M., Yang D. *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., and acetogenic species in clostridial rRNA homology group // Int. J. Sys. Bacteriol. – 1993. – V. 43. – P. 232–236.

235. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P., Zaslavsky L., Lomsadze A., Pruitt K.D., Borodovsky M., Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44. – № 14. – P. 6614–6624.
236. Tesson F., Hervé A., Mordret E., Touchon M., d’Humières C., Cury J., Bernheim A. Systematic and quantitative view of the antiviral arsenal of prokaryotes // *Nat. Commun.* – 2022. – V. 13. – 2561.
237. Thauer R.K., Jungermann K., Decker K. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria // *Bacteriological Reviews.* – 1977. – V. 41. – № 1. – P. 100–180.
238. Tomas A.F., Karakashev D., Angelidaki I. *Thermoanaerobacter pentosaceus* sp. nov., an anaerobic, extremely thermophilic, high ethanol-yielding bacterium isolated from household waste // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2013. – V. 63. – P. 2396–23404.
239. Toshchakov S.V., Kublanov I.V., Messina E., Yakimov M. M., Golyshin P.N. Hydrocarbon and lipid microbiology protocols. genetic, genomic and system analyses of communities // In: *Genomic Analysis of Pure Cultures and Communities* (Eds McGenity T.J., Timmis K.N., Fernandez B.N.). *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols.* – Berlin, Germany: Springer-Verlag, 2015. – T. 10.
240. Tremblay P. L., Zhang T., Dar S. A., Leang C., Lovley D. R. The Rnf complex of *Clostridium ljungdahlii* is a proton-translocating ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase essential for autotrophic growth // *mBio.* – 2012. – V.4. – e00406-12.
241. Trüper H.G., Schlegel H.G. Sulphur metabolism in *Thiorhodaceae* I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii* // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 1964. – V. 30. – P. 225–238.
242. Vecchini Santaella N., Sousa D.Z., Stams A.J.M. *Moorella caeni* sp. nov., isolated from thermophilic anaerobic sludge from a methanol-fed reactor // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2023. – V. 73. – 005905.

243. Venkiteshwaran K., Bocher B., Maki J., Zitomer D. Relating Anaerobic Digestion Microbial Community and Process Function // Microbiol Insights. – 2016. – V. 8. - № Suppl 2. – P. 37–44.
244. Vignais P.M., Billoud B., Meyer J. Classification and phylogeny of hydrogenases // FEMS Microbiol Rev. – 2001. – V. 25. – P. 455–501.
245. Visser M., Pieterse M.M., Pinkse M.W., Nijssse B., Verhaert P.D.E.M., de Vos W.M., Schaap P.J., Stams, A.J.M. Unravelling the one-carbon metabolism of the acetogen *Sporomusa* strain An4 by genome and proteome analysis // Environmental Microbiology. – 2016. – V. 18. – P. 2843–2855.
246. Wagner I.D., Zhao W., Zhang C.L., Romanek C.S., Rohbe M., Wiegel J. *Thermoanaerobacter uzonensis* sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium isolated from a hot spring within the Uzon Caldera, Kamchatka, Far East Russia // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2008. – V. 58. – P. 2565–2573.
247. 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. – e112963.
248. Walker C.B., He Z., Yang Z.K., Ringbauer J.A. Jr, He Q., Zhou J., Voordouw G., Wall J.D., Arkin A.P., Hazen T.C., Stolyar S., Stahl D.A. The electron transfer system of syntrophically grown *Desulfovibrio vulgaris* // J Bacteriol. – 2009. – V. 191. – P. 5793–5801.
249. Wang S., Huang H., Kahnt J., Mueller A.P., Köpke M., Thauer R.K. NADP-specific electron-bifurcating [FeFe]-hydrogenase in a functional complex with formate dehydrogenase in *Clostridium autoethanogenum* grown on CO // J Bacteriol. – 2013. – V. 195. – № 19. – P. 4373-4386.
250. Waschinger L.M., Poehlein A., Daniel R., Rosenbaum F.P., Müller V. A cytochrome c-containing periplasmic nitrate reductase in the acetogen *Sporomusa ovata* // Environ Microbiol. – 2026. – V. 28. – № 1. – e70228.

251. Way J., Sherman T., Leleika S., Crippen K., Wilson R., Fida T.T. Enrichment and comparative metagenomics of microbes involved in biocorrosion of gas transport or storage steel infrastructure // *Front Microbiol.* – 2026. – V. 17. – 1771929.
252. Weghoff M. C., Bertsch J., Müller V. A novel mode of lactate metabolism in strictly anaerobic bacteria // *Environmental microbiology.* – 2015. – V. 17. – № 3. – P. 670–677.
253. Weghoff M.C., Müller V. CO metabolism in the thermophilic acetogen *Thermoanaerobacter kivui* // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2016. – V. 82. – №8. – P. 2312–2319.
254. Westphal L., Wiechmann A., Baker J., Minton N. P., Müller V. The Rnf complex is an energy coupled transhydrogenase essential to reversibly link cellular NADH and ferredoxin pools in the acetogen *Acetobacterium woodii* // *Journal of Bacteriology.* – 2018. – V. 200. – e00357–e1318.
255. Whitham J.M., Tirado-Acevedo O., Chinn. M.S., Pawlak J.J., Grunden A.M. Metabolic response of *Clostridium ljungdahlii* to oxygen exposure // *Appl Environ Microbiol* – 2015. – V. 81. – № 24. – P. 8379-8391.
256. Wiegel J., Braun M., Gottschalk G. *Clostridium thermoautotrophicum* species novum, a thermophile producing acetate from molecular hydrogen and carbondioxide // *Curr. Microbiol.* – 1981. – V. 5. – P. 255–260.
257. Wieringa K. T. Over Het Verdwijnen van Waterstof En Koolzuur Onder Anaerobe Voorwaarden // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 1936. – V. 3. – P. 263-273.
258. Wohlfarth G., Diekert G. Thermodynamics of methylenetetrahydrofolate reduction to methyltetrahydrofolate and its implications for the energy metabolism of homoacetogenic bacteria // *Arch. Microbiol.* – 1991. – V. 155. – P. 378–381.
259. Wohlfarth G., Geerligs G., Diekert G. Purification and properties of a NADH-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase from *Peptostreptococcus productus* // *European Journal of Biochemistry.* – 1990. – V. 192. – P. 411–417.
260. Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of methane by bacterial extracts // *The Journal of Biological Chemistry.* – 1963. – V. 238. – P. 2882–2888.

261. Wolin M.J., Miller T.L., Collins M.D., Lawson P.A. Formate-dependent growth and homoacetogenic fermentation by a bacterium from human feces: description of *Bryantella formatexigens* gen. nov., sp. nov. // Appl Environ Microbiol. – 2003. – V. 69. – № 10. – P. 6321–6326.
262. Wood H.G., Ljungdahl L.G. Autotrophic character of acetogenic bacteria. // In: Variations in Autotrophic Life (Eds. J.M. Shively, L.L. Barton). – San Diego, USA: Academic Press, 1991. – P. 201-250.
263. Xie Z., Tang H. ISEScan: automated identification of insertion sequence elements in prokaryotic genomes // Bioinformatics. – 2017. – V. 33. – P. 3340–3347.
264. Xu J., Wang J., Ma C., Wei Z., Zhai Y., Tian N., Zhu Z., Xue M., Li D. Embracing a low-carbon future by the production and marketing of C1 gas protein // Biotechnol. Adv. – 2023. – V. 63. – P. 108096.
265. Yamamoto K., Murakami R., Takamura Y. Isoprenoid quinine, cellular fatty acid composition and diaminopimelic acid isomers of newly classified thermophilic anaerobic Gram-positive bacteria // FEMS Microbiol. Lett. – 1998. – V. 161. – P. 351–358.
266. Yang S., Lv Y., Liu X., Wang Y., Fan Q., Yang Z., Boon N., Wang F., Xiao X., Zhang Y. Genomic and enzymatic evidence of acetogenesis by anaerobic methanotrophic archaea // Nature Communications. – 2020. – V. 11. – № 1. – P. 3941.
267. Yi J., Huang H., Liang J., Wang R., Liu Z., Li F., Wang S. A heterodimeric reduced-ferredoxin-dependent methylenetetrahydrofolate reductase from syngas-fermenting *Clostridium ljungdahlii* // Microbiol Spectr. – 2021. – V. 9. – № 2. – e0095821.
268. Yoshida M., Muneyuki E., Hisabori T. ATP synthase – a marvellous rotary engine of the cell // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2001. – V. 2. – P. 669–677.
269. Yu H., Schut G.J., Haja D.K., Adams M.W.W., Li H. Evolution of complex I-like respiratory complexes // J Biol Chem – 2021. – V. 296. – 100740.
270. Yu H., Wu C.H., Schut G.J., Haja D.K., Zhao G., Peters J.W., Adams M.W.W., Li H. Structure of an ancient respiratory system // Cell. – 2018. – V. 173. – № 7. – P. 1636-1649. – e16.

271. Zavarzina D.G., Maslov A.A., Merkel A.Y., Kharitonova N.A., Klyukina A.A., Baranovskaya E.I., Baydariko E.A., Potapov E.G., Zayulina K.S., Bychkov A.Y., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Gavrillov S.N. Analogs of Precambrian microbial communities formed de novo in Caucasian mineral water aquifers // mBio. – 2025. – V.16. – e02831–24.
272. Zhang L., Shen Q., Pang C.H., Chao W., Tong S., Kow K.W., Lester E., Wu T., Shang I., Song X., Sun N., Wei W. Life cycle assessment of bio-fermentation ethanol production and its influence in China's steeling industry // J. Clean. Prod. – 2023. – V. 397. – 136492.
273. Zhilina T.N., Detkova E.N., Rainey F.A., Osipov G.A., Lysenko A.M., Kostrikin N.A., Zavarzin G.A. *Natronoincola histidinovorans* gen. nov., sp. nov., a new alkali-lipophilic acetogenic anaerobe // Curr. Microbiol. – 1998. – V. 37. – P. 177–185.
274. Zhilina T.N., Zavarzin G.A., Detkova E.N., Rainey F.A. *Natroniella acetigena* gen. nov. sp. nov., an extremely haloalkaliphilic, homoacetic bacterium: a new member of *Haloanaerobiales* // Curr Microbiol. – 1996. – V. 32. – № 6. – P. 320–326.
275. Zhu H., Fu B., Lu S., Liu H., Liu H. *Clostridium bovisfaecis* sp. nov., a novel acetogenic bacterium isolated from cow manure // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2018. – V. 68. – P. 2956–2959.
276. Zhu H.-F., Liu Z.-Y., Zhou X., Yi J.-H., Lun Z.-M., Wang S.-N., Tang W.-Z., Li F.-L. Energy Conservation and Carbon Flux Distribution During Fermentation of CO or H₂/CO₂ by *Clostridium ljungdahlii* // Front. Microbiol. – 2020. – V. 11 – P. 416.
277. Zinder S.H., Koch M. Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture // Archives of Microbiology. – 1984. – V. 138. – №3. – P. 263–272.
278. Zippa E.V., Ukraintsev A.V., Chernyavskii M.K., Fedorov I.A., Poturay V.A., Domrocheva E.V., Mukhortina N.A. Thermal waters in the central part of Baikal Rift Zone: Hydrogeochemistry and geothermometry (Republic of Buryatia, Russia) // Geothermics. – 2025. – V. 130. – 103317.