

Геномика и физиология нитчатых бесцветных серобактерий

Грабович М.Ю.^{1*}, Руденко Т.С.¹, Смольяков Д.Д.¹, Равин Н.В.²

¹ Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

² Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

* margarita_grabov@mail.ru

Ключевые слова: бесцветные серобактерии; *Thiothrix*; *Beggiatoa*; метагеном; таксономия

Мотивация и цель: Бесцветные серобактерии – это одна из загадочных групп литотрофных прокариот. Многие из них характеризуются гигантскими размерами (20–750 мкм), среди них преобладают некультивируемые формы, они откладывают элементную серу внутри клеток (до 80 % от сухого веса), в природных биотопах, как правило, доминируют, образуя мощные видимые невооруженным глазом маты и обрастания [1].

Представительная коллекция изолятов рода *Thiothrix*, полученная нашей группой, позволила выявить проблему в идентификации изолятов: большинство культур имели высокий уровень гомологии по 16S rRNA, которая варьирует в пределах 98–99 %, что позволяет предположить, что они являются штаммами одного вида. Эта проблема усложнялась тем, что представителей рода *Thiothrix* объединяет схожий фенотип – нитчатые бесцветные серобактерии, образуют розетки и внутриклеточные включения элементной серы при росте в присутствии сероводорода и тиосульфата, и, как правило, все представители рода имеют унифицированную схему основных метаболических путей [2]. Проблема частично решилась с появлением возможности сборки геномов (MAG) из метагеномов. Однако иногда наблюдаемое присутствие в образце нескольких близких, но генетически отличающихся штаммов, препятствует как сборке метагеномных контигов, так и их корректному биннингу для сборки MAG. Таким образом, отсутствие достоверных филогенетических маркеров и небольшое количество изолятов препятствуют установлению точного филогенетического родства в роде *Thiothrix* [3, 4].

За последнее десятилетие семейство *Beggiatoaceae* было значительно расширено во многом благодаря данным метагеномного анализа. Однако описание новых таксонов в семействе преимущественно основано на морфологии, а геномные данные не содержат эту информацию. Это, в свою очередь, привело к возникновению большого количества новых кандидатных родов, а многие из уже описанных отсутствуют в современной геномной таксономии этого семейства (Genome Taxonomy Database, GTDB).

Методы и алгоритмы: Метагеномное секвенирование и сборка геномов, геномный анализ и аннотация, филогенетический анализ.

Результаты: Мы проанализировали возможность использования различных консервативных генов (около 100) в качестве филогенетических маркеров для рода *Thiothrix*, отличных от 16S rRNA. Установлено, что уровни сходства нуклеотидных последовательностей генов тРНК(Пс)-лизидинсинтазы (*tilS*) и β -субъединицы РНК-полимеразы (*rpoB*) хорошо согласуются со средними

значениями нуклеотидной идентичности (ANI) между геномами различных представителей рода *Thiothrix*. Топологии филогенетических деревьев, построенных на основе последовательностей *tilS* и *rpoB*, сходны с топологией дерева, построенного на основе последовательностей 120 консервативных маркерных генов. Высокопроизводительное секвенирование фрагментов гена *tilS* было использовано для профилирования микробногомата с *Thiothrix* из сульфидного источника, что позволило выявить известные виды *Thiothrix* и новых филоотипы видового уровня. Таким образом, использование *tilS* и *rpoB* в качестве филогенетических маркеров позволит проводить экспресс-анализ чистых культур и природных сообществ с целью филогенетической идентификации представителей рода *Thiothrix*.

Создана полногеномная филогения рода *Thiothrix*, основанная на широкой выборке секвенированных геномов. К началу наших исследований филогения рода *Thiothrix* была в зачаточном виде, так как видовое разнообразие было представлено 5 видами, а геномы были просеквенированы лишь для 3 видов. С применением филогенетического анализа, основанного на полногеномных последовательностях, нам удалось расширить род до 15 видов, для 9 из которых нами определены геномные последовательности. Также нами был описан новый род в составе семейства *Thiothrichaceae* '*Candidatus Thiocaldithrix*' gen. nov.

Проведен пангеномный анализ рода *Thiothrix*. Коровый геном включает гены диссимиляционного метаболизма серы и центральных метаболических путей; вспомогательный геном – гены диссимиляционной нитрат- и тиосульфат-редукции, фиксации азота; уникальные гены – гипотетические белки, транспортеры, регуляторы транскрипции, метилтрансферазы, транспозазы и системы токсинов-антитоксинов. Впервые показана способность большинства представителей рода *Thiothrix* к анаэробному дыханию в присутствии нитратов и тиосульфата, а также наличие у некоторых представителей рода *Thiothrix* «натриевой» биоэнергетики, включая Na^+ -АТФазу. Можно предполагать, что дуалистичность энергетики позволяет этим бактериям в микроаэробных и анаэробных условиях перейти на более экономичный энергорегим за счет того, что биомембраны имеют меньшую утечку по натрию, чем по протону, и, следовательно, дольше сохраняют электрохимический градиент ионов Na^+ на мембране в микроаэробных и анаэробных условиях.

Семейство *Beggiatoaceae* в настоящее время представлено 25 родами в GTDB, из которых только шесть имеют определенный таксономический статус. В результате метагеномного анализа бактериальных матов, скапливающихся в ламинариевой «Помойке» на глубине 15–18 м в Белом море, удалось получить два MAGs. На основе проведенного филогенетического анализа один из них, MAG WS_Bin3, был описан как новый род в семействе *Beggiatoaceae* с предложенным названием '*Candidatus Albibeggiatoa psychrophila*' gen., nov., sp. nov. WS_Bin3. Таким образом, идентифицирован кандидатный род «BB20», в составе которого находится WS_Bin3 с двумя дополнительными видами.

Второй MAG, WS_Bin1, оказался штаммом ранее описанного вида '*Ca. Parabeggiatoa communis*' в составе ранее описанного рода '*Ca. Parabeggiatoa*' [5]. Учитывая принадлежность MAG WS_Bin1 к роду '*Ca. Parabeggiatoa*' на основе гомологии гена 16S рРНК, кандидатный род «UBA10656» был определен как '*Ca. Parabeggiatoa*' с тремя новыми видами помимо '*Ca. Parabeggiatoa communis*'. Сравнительный анализ геномов позволил выявить основные сходства и различия

в метаболизме у представителей родов '*Candidatus Parabeggiatoa*' и '*Candidatus Albibeggiatoa*'.

Выводы: Обобщены многолетние исследования по изучению генетических основ природного разнообразия, физиологии и таксономии одной из групп бесцветных серобактерий рода *Thiothrix*. Для создания достоверной филогении рода были определены геномы 9 видов рода *Thiothrix*. С учетом известных и новых геномных последовательностей была предложена обновленная филогения рода *Thiothrix*. Филогения, основанная на использовании полногеномных последовательностей, позволила внести ясность в таксономию рода *Thiothrix*. На основе полногеномного анализа создана обновленная филогения для семейства *Beggiatoaceae*, в частности для родов '*Candidatus Parabeggiatoa*' и '*Candidatus Albibeggiatoa*', а также внесена ясность в понимание метаболического потенциала бесцветных серобактерий из этих родов.

Получение чистых культур и их геномных сиквенсов помогли бы совершить прорыв в таксономии бесцветных серобактерий, но подавляющее большинство бактерий этой группы относятся к группе сложно культивируемых, а многие из них являются некультивируемыми формами. Поэтому на данном этапе лишь метагеномный подход наряду с полевыми наблюдениями и микроскопическим анализом морфологии бактерий будут способствовать разрешению таксономии бесцветных серобактерий.

Финансирование: Исследование поддержано Российским научным фондом (№ 20-14-00137, <https://rscf.ru/en/project/20-14-00137/>).

Genomics and physiology of filamentous colorless sulfur bacteria

Grabovich M.Yu.^{1*}, Rudenko T.S.¹, Smolyakov D.D.¹, Ravin N.V.²

¹ Voronezh State University, Voronezh, Russia

² Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

* margarita_grabov@mail.ru

Key words: colorless sulfur bacteria; *Thiothrix*; *Beggiatoa*; metagenome; taxonomy

Motivation and Aim: Colorless sulfur bacteria are one of the most interesting groups of lithotrophic prokaryotes. Many of them are characterized by giant sizes (20–750 µm), uncultured forms prevail among them, it deposit elemental sulfur intracellularly (up to 80 % of their dry weight), and in natural biotopes, as a rule, dominate, forming thick mats and fouling visible to the naked eye [1].

A representative collection of isolates of the genus *Thiothrix* obtained by our group revealed a problem in the identification of isolates: most bacterial cultures had a high level of 16S rRNA homology, which varies between 98–99 %, suggesting that they are strains of the same species. This problem is complicated by the fact that representatives of the genus *Thiothrix* share a similar phenotype: filamentous colorless sulfur bacteria forming rosettes and intracellular inclusions of elemental sulfur under growth in the presence of hydrogen sulfide and thiosulfate, and as a rule, all representatives of the

genus have a unified scheme of basic metabolic pathways [2]. This problem was partially solved with the advent of the ability to assemble MAGs from metagenomic sequences. However, the frequently observed presence of several similar but genetically different strains in an environmental sample prevents both the assembly of metagenomic contigs and their correct binning into MAGs. Thus, the lack of reliable phylogenetic markers made it difficult to determine the exact phylogenetic relationship of the already described species, as well as that of new isolates [3, 4].

The family *Beggiatoaceae* has greatly expanded over the last decade, mainly due to metagenomic analysis. However, the description of new taxa in the family is predominantly based on morphology, while genomic data, in contrast, are devoid of this information. This, in turn, has led to a large number of new unidentified candidate genera, while many of the already described genera are absent from the current taxonomy of the family according to the Genomic Taxonomy Database (GTDB).

Methods and Algorithms: Metagenome sequencing and assembly of MAGs, genome analysis and annotation, phylogenetic analysis.

Results: We analyzed the possibility of using various conserved genes (about 100) as phylogenetic markers for the genus *Thiothrix* different from 16S rRNA. We found that the nucleotide sequence similarity levels of tRNA(Ile)-lysine synthase (*tilS*) and β -subunit RNA polymerase (*rpoB*) genes align well with the average nucleotide identity (ANI) values between the genomes of different representatives of the genus *Thiothrix*. The topologies of phylogenetic trees based on *tilS* and *rpoB* sequences are similar to those of a tree based on the sequences of 120 conserved marker genes. High-throughput sequencing of *tilS* gene fragments was used to profile microbial mat with *Thiothrix* from a sulfide source, which made it possible to identify known *Thiothrix* species and new species-level phylotypes. Thus, the use of *tilS* and *rpoB* as phylogenetic markers will allow express analysis of pure cultures and natural communities for phylogenetic identification of representatives of the genus *Thiothrix*.

We have constructed a full-genome phylogeny of the genus *Thiothrix* based on a wide sample of sequenced genomes. At the beginning of our studies, the phylogeny of the genus *Thiothrix* was in its infancy, as species diversity was represented by 5 species, and the genomes have been sequenced for only 3 species. Using phylogenetic analysis based on full-genome sequences, we were able to expand the genus to 15 species, for 9 of which we have identified genomic sequences. We also described a new genus in the family *Thiothrichaceae* '*Candidatus* Thiocaldithrix' gen. nov. that is phylogenetically close to the genus *Thiothrix*.

We obtained a pangenome of the genus *Thiothrix*. The core genome includes genes of dissimilatory sulfur metabolism and central metabolic pathways; the auxiliary genome includes genes of dissimilatory nitrate and thiosulfate reduction, nitrogen fixation; unique genes include hypothetical proteins, transporters, transcription regulators, methyltransferases, transposases, and toxin-antitoxin systems.

We have shown for the first time the ability of most representatives of the genus *Thiothrix* to anaerobic respiration in the presence of nitrate and thiosulfate, as well as the presence of "sodium" bioenergetics, including Na⁺-ATPase, in some representatives of the genus *Thiothrix*. It can be assumed that the duality of energy allows these bacteria, under microaerobic and anaerobic conditions, to transition to a more economical energy regime to a more economical energy regime due to the fact that biomembranes have less leakage by sodium than by proton and consequently keep the electrochemical gradient of Na⁺ ions on the membrane longer.

The family *Beggiatoaceae* is currently represented by 25 genera in the GTDB, of which only six have a definite taxonomic status. Two MAGs were assembled as a result of metagenome analysis of bacterial sulfur mats formed on decaying laminaria remnants in the sea bay “Laminaria dump” at a depth of 15–18 m in the White Sea. Based on phylogenetic analysis, one of them, MAG WS_Bin3, was assigned to a new genus and species in the family *Beggiatoaceae* and named ‘*Candidatus Albibeggiatoa psychrophila*’ gen., nov., sp. nov. Accordingly, the candidate genus ‘BB20’ was identified, which includes three species.

The other MAG, namely WS_Bin1, turned out to be a strain of the previously described species ‘*Candidatus Parabeggiatoa communis*’ within the earlier described genus ‘*Candidatus Parabeggiatoa*’ [5]. Considering that MAG WS_Bin1 belongs to the genus ‘*Ca. Parabeggiatoa*’ on the basis of 16S rRNA gene homology, the candidate genus ‘UBA10656’ was assigned to the genus ‘*Ca. Parabeggiatoa*’, comprising three new species in addition to the species ‘*Ca. Parabeggiatoa communis*’.

Comparative analysis of genomes revealed the main similarities and differences in the metabolism of the genera ‘*Ca. Parabeggiatoa*’ and ‘*Ca. Albibeggiatoa*’.

Conclusion: Long-term studies on the genetic basis of natural diversity, physiology and taxonomy of one of the groups of colorless sulfur bacteria of the genus *Thiothrix* are summarized. To create a reliable phylogeny of the genus, the genomes of 9 species of the genus *Thiothrix* were determined. Based on the known and new genomic sequences, an updated phylogeny of the genus *Thiothrix* was proposed. A phylogeny based on the use of full-genome sequences has provided clarity to the taxonomy of the genus *Thiothrix*. An updated phylogeny for the family *Beggiatoaceae* was established based on a full-genome analysis, in particular, for the genera ‘*Ca. Parabeggiatoa*’ and ‘*Ca. Albibeggiatoa*’, was developed. In addition, the insight into the metabolic potential of the colorless sulfur bacteria of these genera was clarified.

Obtaining pure cultures and their genome sequences could help to make a breakthrough in the taxonomy of colorless sulfur bacteria. However, an obstacle to this task is the difficulty of culturing or even the impossibility of culturing the vast majority of bacteria of this group. Therefore, at present, only a metagenomic approach along with field observations and microscopy analysis of bacterial morphology will help to solve the problem of taxonomy of colorless sulfur bacteria.

Funding: The study is supported by the Russian Science Foundation (No. 20-14-00137, <https://rscf.ru/en/project/20-14-00137/>).

Список литературы/References

1. Nelson D.C., Castenholz R.W. Use of reduced sulfur compounds by *Beggiatoa* sp. *J Bacteriol.* 1981;147(1):140-154. doi 10.1128/jb.147.1.140-154.1981
2. Grabovich M.Y., Ravin N.V., Boden R. *Thiothrix*. In: Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, 2023; 21
3. Howarth R., Unz R.F., Seviour E.M. et al. Phylogenetic relationships of filamentous sulfur bacteria (*Thiothrix* spp. and Eikelboom type 021N bacteria) isolated from wastewater-treatment plants and description of *Thiothrix eikelboomii* sp. nov., *Thiothrix unzii* sp. nov., *Thiothrix fructosivorans* sp. nov. and *Thiothrix defluvii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49(4):1817-1827. doi 10.1099/00207713-49-4-1817
4. Rossetti S., Blackall L.L., Levantesi C., Uccelletti D., Tandoi V. Phylogenetic and physiological characterization of a heterotrophic, chemolithoautotrophic *Thiothrix* strain isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003;53(5):1271-1276. doi 10.1099/ijls.0.02647-0
5. Salman V., Amann R., Girth A.C. et al. A single-cell sequencing approach to the classification of large, vacuolated sulfur bacteria. *Syst Appl Microbiol.* 2011;34(4):243-259. doi 10.1016/j.syapm.2011.02.001