

Ацетогенные прокариоты с новыми механизмами запасания энергии

Фролов Е.Н.*, Гололобова А.В., Ельченинов А.Г., Лебединский А.В.

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

* evgenii_frolov_89@mail.ru

Ключевые слова: ацетогенез; восстановительный глициновый путь; полисульфидредуктаза; путь Вуда–Льюнгаля

Мотивация и цель: Определение величины минимального энергетического выхода реакции, достаточного для использования клеткой (биологический квант энергии), является одной из важнейших проблем современной биологии. Объектом исследования выступают микроорганизмы, живущие за счёт биохимических реакций, дающих минимальный выход энергии, к которым относятся ацетогенные прокариоты, формиатотрофные гипертермофильные археи и синтрофные микроорганизмы, осуществляющие окисление спиртов и жирных кислот. Решение данной проблемы приведёт не только к пониманию границ распространения жизни на Земле, но и открытию новых метаболических процессов, позволяющих жить в условиях, близких к термодинамическому пределу. Решение поставленной проблемы имеет и важный практический аспект ввиду высокого биотехнологического потенциала ацетогенных прокариот, который обусловлен их уникальной способностью синтезировать *de novo* органические соединения из H_2/CO_2 , CO или же синтез-газа. Целью работы является изучение новых метаболических процессов, влияющих на величину биологического кванта энергии у ацетогенных бактерий, а также исследование распространения выявленных метаболических процессов среди прокариот.

Методы и алгоритмы: Выделение и характеристика новых микроорганизмов была выполнена на модифицированной среде Пфеннига с применением стандартных микробиологических процедур. Определение полной последовательности геномов было выполнено с применением технологий секвенирования Illumina и Oxford Nanopore с последующей гибридной сборкой с помощью SPAdes, Unicycler и Canu. Первичная аннотация генома была выполнена с помощью NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline в процессе подачи генома на портал NCBI. Дополнительные аннотации, направленные на улучшение предсказания функции белков, были выполнены с помощью IMG/MER и веб-сервера RAST, а также поиска ключевых метаболических генов вручную. Поиск потенциальных ацетогенов, в том числе обладающих новыми механизмами запасания энергии, был проведен в общедоступных базах данных прокариотных геномов. Кроме того, для выполнения данной работы была создана локальная база данных на основе репрезентативных геномов GTDB (47 894 геномов, представляющих все виды прокариот), был организован необходимый для поисков функционал, и было исследовано распределение ключевых детерминант известных и гипотетических вариантов ацетогенеза.

Результаты: Из горячих источников полуострова Камчатка были выделены и охарактеризованы первые облигатно хемолитоавтотрофные ацетогенные

бактерии, штаммы 3443-3Ac и 3819-GS1, которые являются облигатными анаэробами, умеренными термофилами, растут при слабокислых и нейтральных значениях pH и не требуют наличия витаминов в среде. Штамм 3443-3Ac рос исключительно в хемолитоавтотрофных условиях в присутствии H_2/CO_2 , CO или формиата, а конечным продуктом метаболизма являлся ацетат. В случае внесения в среду элементной серы и полисульфида помимо ацетата начинал образовываться сульфид. На основании полученных результатов физиологических и филогеномных исследований предложен новый род и вид *Aceticella autotrophica*. Анализ генома позволил выявить гены, кодирующие полный набор белков автотрофного ацетогенеза, в котором окислительный модуль был представлен бифуркационной гидрогеназой, восстановительный – путём Вуда-Льюнгаля (ПВЛ), а энергетический – ECH гидрогеназой и H^+ -зависимой АТФ-синтазой. Предложенные схемы метаболизма *Ac. autotrophica* 3443-3Ac^T при росте на H_2/CO_2 , HCOOH и CO предполагают работу одного и того же ферментативного аппарата, различия заключаются в участии монофункциональной СО-дегидрогеназы при росте на СО и противоположном направлении работы H_2 -зависимой CO_2 -редуктазы при росте на формиате. Для *Ac. autotrophica* 3443-3Ac^T был предложен новый механизм запасания энергии – «облегчённый» ацетогенез, при котором катаболическую функцию ПВЛ, связанную с реокислением восстановительных эквивалентов, частично берет на себя НАД(Ф)Н-полисульфидзависимая редуктаза. Увеличение количества окисленного НАД(Ф)⁺ позволяет бифуркационной гидрогеназе более эффективно вырабатывать низкопотенциальные ферредоксины, необходимые для генерации мембранного потенциала ECH комплексом.

Штамм 3819-GS1 рос исключительно в хемолитоавтотрофных условиях с H_2 в качестве донора электронов и CO_2 в качестве акцептора электронов и источника углерода, а единственным продуктом метаболизма является ацетат. Новый изолят не был способен к восстановлению внешних акцепторов электронов. На основании филогеномных исследований предложен новый род и вид *Acetitalea autotrophica*. Анализ генома выявил существенные отличия метаболизма нового изолята от метаболизма всех известных на данный момент ацетогенных микроорганизмов. Было предположено, что окислительный модуль представлен бифуркационной гидрогеназой, восстановительный – восстановительным глициновым путём, а энергетический – 11-субъединичным Nuo-подобным мембранным комплексом и H^+ -зависимой АТФ-синтазой. Таким образом, нами был предложен новый механизм «глицинового» ацетогенеза.

Были выработаны критерии отнесения микроорганизмов к потенциальным ацетогенам («классическим» и гипотетическим) и критерии, позволяющие судить о наличии или отсутствии у них известных для ацетогенов механизмов запасания энергии (Rnf-комплекс и ECH-гидрогеназа). Было выявлено 280 потенциальных «классических» ацетогенов в 18 филумах. Большинство относились к филумам *Bacillota_A* (178) и *Bacillota_B-G* (от 22 до 4) и было рассеяно внутри этих филумов, численно не преобладая ни в одной из ее линий. Эти результаты согласуются с представлением о вертикальном наследовании способности к «классическому» ацетогенезу и с нашим выводом о вертикальном наследовании этой способности, сделанным на основании филогенетических деревьев ключевых детерминант. Был обнаружен 61 геном потенциальных необычных ацетогенов (ПВЛ при отсутствии Rnf и ECH). Однако в тех случаях, когда это были геномы

культивируемых микроорганизмов, они чаще всего принадлежали сульфатредукторам из порядков *Desulfotomaculales* и *Desulfitobacterales*, и ПВЛ у них скорее всего выполняет иную чем ацетогенез функцию. Было обнаружено 187 геномов потенциальных «глициновых» ацетогенов, и из них всего в шести отсутствовали гены ECH и Rnf. Таким образом, паттерн детерминант, наблюдаемый у «глицинового» ацетогена *At. autotrophica* 3819-GS1, является весьма редким. Интересно, что из этих 187 потенциальных ацетогенов 27 имели детерминанты как глицинового пути, так и ПВЛ.

Выводы: Таким образом, в ходе проделанной работы были выделены и охарактеризованы первые облигатно хемолитоавтотрофные ацетогенные бактерии, *Aceticella autotrophica* и *Acetitalea autotrophica*. Для *Ac. autotrophica* 3443-3Ac^T предложен новый механизм запасаения энергии – «облегчённый» ацетогенез, при котором катаболическую функцию ПВЛ, связанную с реокислением восстановительных эквивалентов, частично берёт на себя НАД(Ф)Н-зависимая полисульфидредуктаза. Для *At. autotrophica* предложен новый механизм «глицинового» ацетогенеза. Анализ геномных баз данных наличие новых механизмов запасаения энергии также среди бактерий.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 24-14-00177.

Acetogenic prokaryotes with new energy conservation mechanisms

Frolov E.N.*, Gololobova A.V., Elcheninov A.G., Lebedinsky A.V.

Research Center of Biotechnology RAS, Moscow, Russian

* evgenii_frolov_89@mail.ru

Key words: acetogenesis; reductive glycine pathway; polysulfide reductase; Wood–Ljungdahl pathway

Motivation and Aim: Determining the minimum energy yield of a reaction sufficient for use by a cell (biological quantum of energy) is one of the most important problems of modern biology. The objects of the study are microorganisms living due to biochemical reactions that provide minimal energy output. Such microorganisms include acetogenic prokaryotes, formatotrophic hyperthermophilic archaea, and syntrophic microorganisms that carry out the oxidation of alcohols and fatty acids. Solving this problem will lead not only to understanding the boundaries of the distribution of life on Earth, but also to the discovery of new metabolic processes that allow living in conditions close to the thermodynamic limit. Solving this problem also has an important practical aspect due to the high biotechnological potential of acetogenic prokaryotes, which is due to their unique ability to synthesize *de novo* organic compounds from H₂/CO₂, CO or synthesis gas. The aim of this work is to study new metabolic processes affecting the value of biological quantum of energy in acetogenic bacteria and to investigate the distribution of the identified metabolic processes among prokaryotes.

Methods and Algorithms: The isolation and characterization of new microorganisms was performed on modified Pfennig's medium using standard microbiological procedures. Genome sequencing was performed using Illumina and Oxford Nanopore sequencing technologies followed by hybrid assembly using SPAdes, Unicycler and Canu. Primary genome annotation was performed by Prokaryotic Genome Annotation Pipeline during the process of genome submission to NCBI submission portal. Additional annotations

aimed to improve predictions of protein function were performed using IMG/MER System and Rapid Annotation using Subsystem Technology web server and manual curation of key metabolic genes. In databases of prokaryotic genomes, searches were conducted for potential acetogens, including those that have new energy conservation mechanisms. Moreover, a local database was created based on representative GTDB genomes (47,894 genomes representing all species of prokaryotes), the functionalities necessary for the search were organized, and the distribution of key determinants of known and hypothetical variants of acetogenesis was investigated.

Results: The first obligate chemolithoautotrophic acetogenic bacteria, strains 3443-3Ac and 3819-GS1, were isolated from hot springs of Kamchatka peninsula and characterized. These are obligate anaerobes and moderate thermophiles that grow at slightly acidic and neutral pH values and do not require the presence of vitamins in the medium. Strain 3443-3Ac grows exclusively under chemolithoautotrophic conditions in the presence of H_2/CO_2 , CO or formate. The end product of metabolism is acetate. It was also shown to be able to reduce elemental sulfur, polysulfide and thiosulfate, forming sulfide in parallel with acetate. Based on the results of physiological and phylogenomic studies, a new genus and species *Aceticella autotrophica* is proposed. Genomic analysis identified genes encoding all enzymes necessary for autotrophic acetogenesis. The oxidative module was represented by bifurcation hydrogenase, the reductive module, by the Wood-Ljungdahl pathway (WLP), and the energy module, by ECH hydrogenase and H^+ -dependent ATP synthase. The proposed metabolic patterns of *Ac. autotrophica* 3443-3Ac^T during growth on H_2/CO_2 , HCOOH and CO suggest the operation of the same enzymatic apparatus; the differences lie in the involvement of monofunctional CO dehydrogenase during growth on CO and the opposite direction of HDCR operation during growth on formate. For *Ac. autotrophica* 3443-3Ac^T, a new energy conservation mechanism was proposed – “facilitated” acetogenesis, in which the catabolic function of WLP, associated with the reoxidation of reducing equivalents, is in part taken over by a NAD(P)H-dependent polysulfide reductase. The increase in the amount of oxidized NAD(P)⁺ allows bifurcation hydrogenase to more efficiently produce low-potential ferredoxins necessary for the generation of membrane potential by the ECH complex. Strain 3819-GS1 grew exclusively under chemolithoautotrophic conditions with H_2 as the electron donor and CO_2 as the electron acceptor and carbon source, and the only metabolic product was acetate. Thus, it was established that strain 3819-GS1 is also an obligate autotrophic acetogenic bacterium. New isolate is not capable of reducing external electron acceptors. Based on phylogenomic studies, a new genus and species, *Acetitalea autotrophica*, was proposed. Genome analysis revealed significant differences in the metabolism of the new isolate from the metabolism of all currently known acetogenic microorganisms. It was suggested that the oxidative module is represented by bifurcation hydrogenase, the reductive module, by the reductive glycine pathway, and the energy module, by an 11-subunit Nuo-like membrane complex and H^+ -dependent ATP synthase. Thus, we have proposed a new mechanism of “glycine” acetogenesis.

Criteria have been developed for classifying microorganisms as potential acetogens (“classical” and hypothetical), as well as criteria for assessing the presence or absence of energy conservation mechanisms known for acetogens (Rnf-complex and ECH-hydrogenase). 280 potential “classical” acetogens were identified in 18 phyla. The majority belonged to the phyla Bacillota_A (178) and Bacillota_B-G (22 to 4) and were scattered across the taxonomic (phylogenetic) diversity of this group, without being

numerically predominant in any of its lineages. These results are consistent with the idea of vertical inheritance of the capacity for “classical” acetogenesis and with our conclusion about the vertical inheritance of this capacity, made on the basis of phylogenetic trees of key determinants. 61 genomes of potential unusual acetogens (WLP in the absence of Rnf and ECH) were discovered. However, in cases where these were genomes of cultivated microorganisms, they most often belonged to sulfate reducers from the orders *Desulfotomaculales* and *Desulfitobacteriales*, and their WLP most likely performs a function other than acetogenesis. 187 genomes of potential “glycine” acetogens were discovered, and only six of them lacked the ECH and Rnf genes. Thus, the pattern of determinants observed in our “glycine” acetogen *At. autotrophica* 3819-GS1 is quite rare. Interestingly, of these 187 potential acetogens, 27 had determinants of both glycine pathway and WLP.

Conclusion: Thus, the first obligate chemolithoautotrophic acetogenic bacteria, *Aceticella autotrophica* and *Acetitalea autotrophica*, were isolated and characterized. For *Ac. autotrophica* 3443-3Ac^T, a new energy conservation mechanism was proposed – “facilitated” acetogenesis, in which the catabolic function of WLP, associated with the reoxidation of reducing equivalents, is in part taken over by a NAD(P)H-dependent polysulfide reductase. For *At. autotrophica* 3819-GS1^T, a new mechanism of “glycine” acetogenesis was proposed. Analysis of genomic databases revealed a widespread distribution of novel energy conservation mechanisms among bacteria.

Funding: The study is supported by the grant from the Russian Science Foundation No. 24-14-00177.