

НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА МЕХАНИЗМ АВТОТРОФНОЙ АССИМИЛЯЦИИ  
CO<sub>2</sub> У ЗЕЛЕННЫХ СЕРНЫХ БАКТЕРИЙ© 2022 г. Р. Н. Ивановский<sup>а</sup>, \*, Н. В. Лебедева<sup>а</sup>, Т. П. Турова<sup>б</sup><sup>а</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119191 Россия<sup>б</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: mguru@mail.ru

Поступила в редакцию 19.01.2022 г.

После доработки 25.01.2022 г.

Принята к публикации 25.01.2022 г.

Автотрофная система фиксации CO<sub>2</sub> у *Chlorobaculum limnaeum* штамм С состоит из двух топологически независимых ферментных комплексов: обращенного цикла трикарбоновых кислот (комплекс I), единственным продуктом которого является ацетил-КоА, и нециклического комплекса реакций (комплекс II). В реакциях, катализируемых ферментами комплекса II, из ацетил-КоА, синтезированного в обращенном цикле трикарбоновых кислот, синтезируются все субстраты, используемые для построения клеток. Комплекс I включает две реакции карбоксилирования, катализируемые 2-оксоглутаратсинтазой и изоцитратдегидрогеназой. Комплекс II включает две дополнительные реакции карбоксилирования, катализируемые пируватсинтазой и ФЕП-карбоксилазой. Объединение ферментных комплексов I и II в единую систему автотрофной ассимиляции CO<sub>2</sub> осуществляет цитратсинтаза, отсутствующая в каноническом варианте цикла Арнона-Бюкенана. Ген цитратсинтазы обнаруживается у всех исследованных зеленых серных бактерий и может быть отнесен к генам “домашнего хозяйства”.

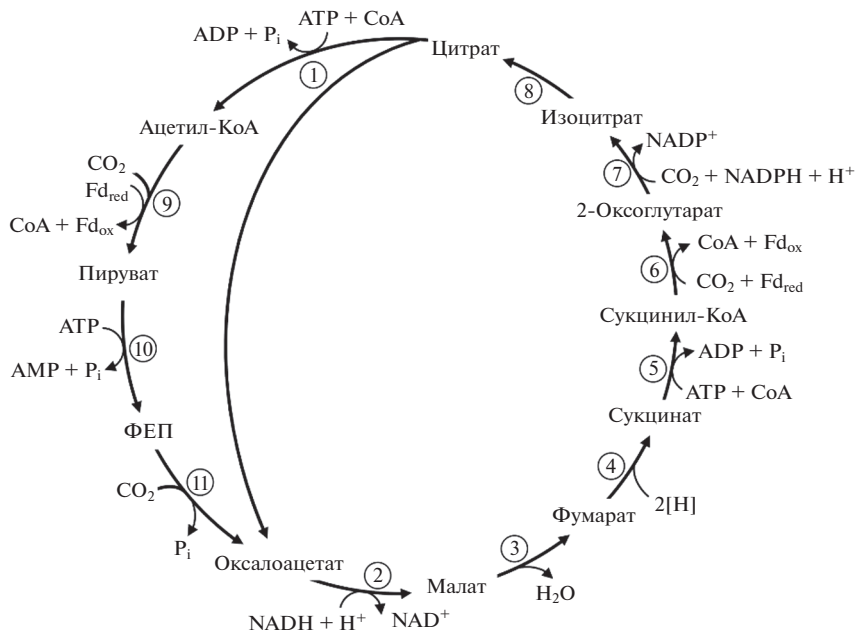
**Ключевые слова:** зеленые серные бактерии, восстановительный цикл трикарбоновых кислот, автотрофная ассимиляция CO<sub>2</sub>

DOI: 10.31857/S0026365622300024

Автотрофная ассимиляция CO<sub>2</sub> у исследованных зеленых серных бактерий осуществляется при участии восстановительного цикла лимонной кислоты (цикл Арнона–Бюкенана). Цикл был впервые описан в 1966 г. (Evans et al., 1966) и окончательно признан в 1980 г. после обнаружения у *Chlorobium limicola* его ключевого фермента: АТФ-зависимой цитратлиазы (Ivanovsky et al., 1980). В настоящее время существует консенсус относительно механизма этого процесса (рис. 1). Ассимиляцию CO<sub>2</sub> через цикл Арнона–Бюкенана осуществляют филогенетически разнообразные автотрофные бактерии, в том числе: аноксигенные фототрофные бактерии (*Chlorobi*), сульфатредуцирующие бактерии (*Desulfobacter*), микроаэрофильные гипертермофильные водородокисляющие бактерии (*Aquifex* и *Hydrogenobacter*) (Hügler, Sievert, 2011). Цикл Арнона–Бюкенана включает четыре фермента, катализирующих реакцию карбоксилирования: 2-оксоглутаратсинтазу, изоцитратдегидрогеназу, пируватсинтазу и ФЕП-карбоксилазу и содержит три специфичных для него фермента: фумаратредуктазу, ферредоксин-зависимую оксоглутаратсинтазу и АТФ-цитратлиазу. В результате реакций цикла синтезируются предшественники

всех соединений, необходимых для построения клеток.

Характерной особенностью метаболизма зеленых серных бактерий является его высокая чувствительность к действию фторацетата. Фторацетат является эффективным ингибитором автотрофной ассимиляции CO<sub>2</sub> (Sirevag, Ormerod, 1970; Ivanovsky et al., 1993). Наиболее вероятной мишенью ингибирующего действия фторацетата является аконитаза, ингибитором которой является фторцитрат (Villafranca, Platus, 1973; Proudfoot et al., 2006). Фторцитрат у зеленых серных бактерий может синтезироваться в цитратсинтазной реакции (ацетил-КоА + оксалоацетат → цитрат) в результате замещения ацетил-КоА на фторацетил-КоА. Это предполагает участие цитратсинтазы в процессе автотрофной фиксации CO<sub>2</sub>. Однако в классическом варианте механизма автотрофной ассимиляции CO<sub>2</sub> у зеленых серных бактерий цитратсинтазная реакция отсутствует. Синтез цитрата в цикле Арнона–Бюкенана происходит в реакции карбоксилирования 2-оксоглутарата: 2-оксоглутарат + CO<sub>2</sub> → цитрат (рис. 1). Цитрат, синтезируемый в этой реакции, не содержит фто-



**Рис. 1.** Механизм автотрофной фиксации CO<sub>2</sub> у зеленых серных бактерий (adapted from Evans M.C.W., Buchanan B.V., Arnon D.I., 1966). 1 – АТФ-цитратлиаза; 2 – малатдегидрогеназа; 3 – фумаратгидратаза; 4 – фумаратредуктаза; 5 – сукцинил-КоА синтаза; 6 – ферредоксин-зависимая кетоглутаратсинтаза; 7 – изоцитратдегидрогеназа; 8 – аконитатгидратаза; 9 – ферредоксин-зависимая пируватсинтаза; 10 – ФЕП-синтаза; 11 – ФЕП-карбоксилаза.

ра и, следовательно, не способен выполнять функцию эндогенного ингибитора автотрофной ассимиляции углекислоты и ингибировать рост зеленых серных бактерий в фотоавтотрофных условиях.

Задачей данной работы было предложить механизм автотрофной ассимиляции CO<sub>2</sub> у зеленых серных бактерий, предполагающий участие цитратсинтазы и позволяющий объяснить ингибирующее действие фторацетата.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Бактерии и условия их культивирования.** Зеленую серную бактерию *Chlorobaculum limnaeum* штамм С (бывшая *Chlorobium limicola* штамм С) из коллекции кафедры микробиологии Московского государственного университета культивировали в фототрофных условиях на среде Ларсена (Larsen, 1952) с NaHCO<sub>3</sub> (3 г/л) и Na<sub>2</sub>S · 9H<sub>2</sub>O (1 г/л). При выращивании бактерий в фотомиксотрофных условиях в качестве источников углерода использовали NaHCO<sub>3</sub> (3 г/л) + ацетат (1 г/л). Культуры выращивали при 25–28°C в 500 мл стеклянных сосудах, полностью заполненных средой.

**Приготовление клеточного экстракта.** Для получения бесклеточных экстрактов клетки, находящиеся в конце экспоненциальной фазы роста, отделяли от среды центрифугированием (9000 об./мин при 6–8°C) и отмывали 0.05 М Tris-HCl буфером (рН 7.5). Полученную биомассу ресу-

спендировали в 7 мл используемого для определения активности фермента буфера и разрушали с помощью X-пресса (“LKB”, Швеция) при избыточном давлении 10 т/см<sup>2</sup>. Неразрушенные клетки и крупные фрагменты отделяли центрифугированием при 35000 g в течение часа. Получившейся супернатант использовали для энзиматических исследований. Определение активности ферментов проводили при комнатной температуре. Содержание белка в опытах 0.5–2.0 мг/мл.

**Ассимиляция клетками меченых субстратов.**

Эксперименты по ассимиляции [<sup>14</sup>C]-меченых субстратов суспензиями клеток проводили в медицинских шприцах на свету (2000 лк). Реакцию начинали добавлением NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> (5 мМ, 0.04 МБк) и останавливали через соответствующие промежутки времени фильтрованием 1 мл клеточной суспензии через нитроцеллюлозные фильтры (0.45 мкм). Фильтры сушили и просчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике LKB RacBeta модель 1127.

**Определение активности ферментов.**

Активность АТФ-цитратлиазы (ЕС 2.3.3.8) определяли по окислению НАДН в сопряженной реакции с малатдегидрогеназой. Реакционная смесь содержала 100 мМ Tris-HCl (рН 8.3), 5 мМ дитиотриэтола (DTE), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 3 мМ АТФ, 0.5 мМ КоА, 0.4 мМ НАДН, 1 ед. малатдегидрогеназы и 3 мМ цитрата. Реакция начиналась добавлением цитрата.

Активность цитратсинтазы (ЕС 4.1.3.1) определяли по оксалоацетат-зависимому выделению КоА из ацетил-КоА. Накопление КоА определяли в реакции с DTNB. Реакционная смесь содержала 100 мМ *Трис*-HCl (pH 7.8), 1 мМ DTNB, 0.2 мМ ацетил-КоА и 20 мМ цитрата. Реакция начиналась добавлением оксалоацетата.

Активность аконитазы (ЕС 4.2.1.3) определяли спектрофотометрически по накоплению *цис*-аконитата при 240 нМ ( $E_{240} - 3.4 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ). Реакционная смесь содержала 100 мМ *Трис*-HCl (pH 7.5) и 10 мМ цитрата. Реакция начиналась добавлением клеточного экстракта.

Активность изоцитратдегидрогеназы (ЕС 1.1.1.42) определяли по изоцитрат-зависимому восстановлению НАДФ. Реакционная смесь содержала 100 мМ *Трис*-HCl (pH 7.5), 5 мМ DTE, 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ НАДФ и 10 мМ изоцитрата. Реакция начиналась добавлением изоцитрата.

Активность малатдегидрогеназы (ЕС 1.1.1.37) определяли по оксалоацетат-зависимому окислению НАДН. Реакционная смесь содержала 100 мМ *Трис*-HCl (pH 7.8), оксалоацетат 4 мМ, 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 5 мМ DTT и 0.3 мМ НАДН. Реакция начиналась добавлением оксалоацетата.

Активность фумаратгидратазы (ЕС 4.2.1.2) измерялась спектрофотометрически при 240 нМ ( $E_{240} - 2.440 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ). Реакционная смесь содержала 100 мМ *Трис*-HCl (pH 7.8), 30 мМ малата. Реакция начиналась добавлением клеточного экстракта.

Активность сукцинатдегидрогеназы (ЕС 1.3.5.1) определяли спектрофотометрически по сукцинат-зависимому восстановлению феррицианида при 420 нМ ( $E_{420} - 1.09 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ). Реакционная смесь содержала 100 мМ *Трис*-HCl (pH 7.5), 2.5 мМ феррицианида, 0.5 мМ сукцината. Реакция начиналась добавлением сукцината.

Активность изоцитратлиазы (ЕС 4.1.3.1) определяли спектрофотометрически по накоплению гидразона глиоксилата при 324 нМ ( $E_{324}$  гидразона глиоксилата  $- 17 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ). Реакционная смесь содержала 100 мМ *Трис*-HCl (pH 7.5), 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 5 мМ фенилгидразина, 1 мМ изоцитрата. Реакция начиналась добавлением изоцитрата.

Активность 2-оксоглутаратдегидрогеназы (ЕС 1.2.4.2) определяли спектрофотометрически по восстановлению НАД при 340 нМ ( $E_{340} - 6.22 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ). Реакционная смесь содержала 100 мМ *Трис*-HCl (pH 7.5), 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ НАД, 0.5 мМ КоА, 10 мМ DTE, 0.5 мМ TPP и 5 мМ 2-оксоглутарата. Реакция начиналась добавлением 2-оксоглутарата.

Активность 2-оксоглутаратсинтазы (ЕС 1.2.7.3), пируватсинтазы (ЕС 1.2.7.1) и фумаратредуктазы измеряли спектрофотометрически по восстановле-

нию метилвиологена при 578 нМ ( $E_{578} - 8 \times 10^3 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ). Реакцию проводили в анаэробных условиях с  $\text{N}_2$  в газовой фазе. Реакционная смесь для КоА-зависимых 2-оксоглутарат- и пируватсинтазы содержала: 100 мМ *Трис*-HCl (pH 7.8), 4 мМ DTE, 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 мМ СоА, 2 мМ MV и 3 мМ 2-оксоглутарата или пирувата. Реакционная смесь для фумаратредуктазы содержала: 100 мМ *Трис*-HCl (pH 7.8), 4 мМ DTE, 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2 мМ MV и 1 мМ фумарата. Дитионит был добавлен шприцем из 5 мМ раствора до появления слабой фиолетовой окраски. Реакция начиналась добавлением 2-оксоглутарата, пирувата или фумарата.

Определение сульфида проводили по модифицированному методу, описанному ранее (Tuerker, Schlegel, 1964). Белок измеряли по методу Лоури, используя бычий сывороточный альбумин в качестве контроля.

**Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей.** Сравнительный анализ генов 16S рРНК, *aclB* и *gltA* проводили с использованием баз данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и PATRIC v.3.6.11. Редактирование и трансляцию секвенированных последовательностей проводили с помощью редактора BioEdit (Hall, 1999). Последовательности были выровнены с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий с помощью программы CLUSTALW v 1.75 (Thompson et al., 1994). Построение филогенетических деревьев исследуемых бактерий проводили с использованием алгоритма neighbor-joining (Saitou, Nei, 1987), реализованного в пакете программ TREECONW (Van de Peer, De Wachter, 1994) и алгоритма Maximum Likelihood, реализованного в пакете программ MEGA11 v 11.0.8.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Активность ферментов, принимающих участие в автотрофной ассимиляции  $\text{CO}_2$  у *Cba. limnaeum* С.** Автотрофная ассимиляция  $\text{CO}_2$  у *Cba. limnaeum* С происходит при участии четырех реакций карбоксилирования: пируватсинтазы, 2-оксоглутаратсинтазы, изоцитратдегидрогеназы и ФЕП-карбоксилазы (табл. 1). При выращивании *Cba. limnaeum* С в фотомиксотрофных условиях на среде, содержащей в качестве источников углерода бикарбонат и ацетат в качестве дополнительного источника углерода, происходит уменьшение активности пируватсинтазы, 2-оксоглутаратсинтазы и изоцитратдегидрогеназы по сравнению с их активностью у клеток, выросших в фотоавтотрофных условиях. В этих условиях *Cba. limnaeum* С включают ацетат в углеродный метаболизм в качестве готового строительного блока, снижая нагрузку на систему фиксации  $\text{CO}_2$ . Активность ФЕП-карбоксилазы в этих условиях напротив увеличивается. Это объясняется ее участием в процессе ассимиляции эк-

**Таблица 1.** Активности ферментов, принимающих участие в ассимиляции CO<sub>2</sub> у штамма *Cba. limnaeum* (в нмоль/мин/мг белка)

Фермент	Условия выращивания	
	Na <sub>2</sub> S + CO <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> S + CO <sub>2</sub> + ацетат
Цитратсинтаза	8.6	7.5
АТФ-цитратлиаза	31.5	8.5
Пируватсинтаза	125.1	65.1
2-Оксоглутаратсинтаза	21.4	14.1
Изоцитратдегидрогеназа	919.0	306.6
Цитраткиназа	8.6	7.5
Аконитаза	6.5	9.8
Сукцинатдегидрогеназа	19.8	29.7
Фумаратредуктаза	64.3	44.6
Фумаратгидратаза	112.2	83.3
Малатдегидрогеназа	109.7	130.3
2-Оксоглутаратдегидрогеназа	0.0	0.0
Изоцитратлиаза	0.0	0.0
Пируваткарбоксилаза	<0.1	<0.1
ФЕП-карбоксилаза	3.6	9.0
ФЕП-карбоксикиназа (ГТФ)	5.2	6.6
ФЕП-карбоксикиназа (АДФ)	<0.1	<0.1
ФЕП-карбоксикиназа	0.9	1.3
Пируваткиназа	5.1	3.2
Пируват-фосфат дикиназа	3.3	1.2
Пируват-H <sub>2</sub> O дикиназа	<0.1	<0.1

зогенного ацетата в фотомиксотрофных условиях (рис. 1).

В дополнение к ферментам цикла Арнона–Бюкенана в клетках *Cba. limnaeum*, выросших как в фотоавтотрофных, так и фотомиксотрофных условиях на среде с ацетатом в качестве дополнительного источника углерода, детектируется активность цитраткиназы (табл. 1). Этот фермент отсутствует в классическом варианте цикла (рис. 1).

**Рост, окисление сульфида и ассимиляция CO<sub>2</sub> зелеными серными бактериями *Cba. limnaeum* С в фотоавтотрофных и фотомиксотрофных условиях.** *Cba. limnaeum* С способен к фотоавтотрофному росту на среде, содержащей CO<sub>2</sub> в качестве источника углерода и H<sub>2</sub>S, как донора электронов, и к фотомиксотрофному на среде с ацетатом, в качестве дополнительного источника углерода. При росте в фотомиксотрофных условиях урожай клеток *Cba. limnaeum* увеличивается на 30–40%. Напротив, скорость фиксации CO<sub>2</sub> и окисления сульфида снижается примерно в этой же пропорции (табл. 2). Эти данные служат дополнительным доказательством того, что ацетат в этих условиях

включается в метаболизм клеток *Cba. limnaeum* в качестве готового строительного блока, что снижает потребность клеток в CO<sub>2</sub> и, следовательно, в сульфиде, как доноре электронов.

**Механизм действия фторацетата на ассимиляцию CO<sub>2</sub>.** Характерной особенностью процесса автотрофной ассимиляции CO<sub>2</sub> у зеленых серных бактерий является его высокая чувствительность к действию фторацетата. Фторацетат в фотоавтотрофных условиях выращивания клеток штамма *Cba. limnaeum* С более чем на 90% ингибирует фиксацию CO<sub>2</sub>, окисление сульфида и рост бактерий (табл. 2 и 3). Минимальная концентрация фторацетата, достаточная для 50% подавления автотрофной ассимиляции CO<sub>2</sub> (IC<sub>50</sub>), равна 2 × 10<sup>-6</sup> М и, соответственно, 5 × 10<sup>-6</sup> М для полного подавления фиксации CO<sub>2</sub> (рис. 2). Наиболее вероятной мишенью ингибирующего действия фторацетата является аконитаза. Этот фермент является обязательным участником процесса ассимиляции CO<sub>2</sub> в цикле Арнона–Бюкенана (рис. 1). Истинным ингибитором аконитаза является не фторацетат, а фторцитрат (Villafranca, Platus, 1973; Proudfoot et al., 2006). У зеленых серных бактерий он мо-

**Таблица 2.** Рост, окисление сульфида и ассимиляция бикарбоната клетками штамма *Cba. limnaeum*

Среда содержит:	Рост*, мкг белка/мл	Потребление сульфида, нм/мин/мг белка	Ассимиляция бикарбоната, нм/мин/мг белка
H <sub>2</sub> S + CO <sub>2</sub>	92.0	59.2	14.6
H <sub>2</sub> S + CO <sub>2</sub> + ацетат	134.0	42.1	10.0
H <sub>2</sub> S + CO <sub>2</sub> + фторацетат	0.6	9.0	0.6
H <sub>2</sub> S + CO <sub>2</sub> + фторацетат + ацетат	119.0	39.9	10.5

\* Скорость роста оценивалась по урожаю клеток за 36 ч культивирования (середины экспоненциальной фазы роста).

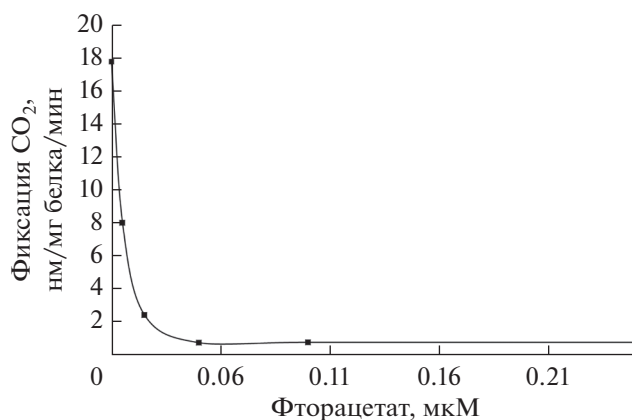
**Таблица 3.** Ассимиляция CO<sub>2</sub> клетками штамма *Cba. limnaeum*, выросшими в фотоавтотрофных условиях и среде с пируватом (в нмоль/мин/мг белка)

Состав среды в опыте	Среда культивирования	
	Na <sub>2</sub> S + CO <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> S + CO <sub>2</sub> + пируват
CO <sub>2</sub> + Na <sub>2</sub> S	14.6	18.0
CO <sub>2</sub> + Na <sub>2</sub> S + ацетат	10.0	18.2
CO <sub>2</sub> + Na <sub>2</sub> S + F-ацетат	0.6	1.8
CO <sub>2</sub> + Na <sub>2</sub> S + F-ацетат + ацетат	10.5	19.0
CO <sub>2</sub> + Na <sub>2</sub> S + пируват	12.9	27.1
CO <sub>2</sub> + Na <sub>2</sub> S + F-ацетат + пируват	0.8	2.0

жет синтезироваться в цитратсинтазной реакции: фторацетил-КоА + оксалоацетат → 2-фторцитрат + КоА, что, в свою очередь, предполагает наличие у штамма *Cba. limnaeum* С цитратсинтазы, катализирующей реакцию синтеза фторцитрата, как эндогенного ингибитора аконитазы. Активность цитратсинтазы обнаруживается в клетках *Cba. limnaeum* С, выросших как в фотоавтотрофных, так и в фотомиксотрофных условиях (табл. 1). Однако эта реакция отсутствует в классическом варианте цикла Арнона-Бюкенана (рис. 1), что не позволяет адекватно интерпретировать механизм ингибирования фторацетатом фиксации CO<sub>2</sub> у зеленых серных бактерий, оставаясь в рамках общепринятых представлений о механизме этого процесса. Наличие у штамма *Cba. limnaeum* С цитратсинтазы, катализирующей реакцию синтеза фторцитрата, как эндогенного ингибитора аконитазы, объясняет высокую чувствительность ассимиляции CO<sub>2</sub> у зеленых серных бактерий к действию фторацетата.

Ацетат снимает ингибирующее действие фторацетата на автотрофную ассимиляцию CO<sub>2</sub> (табл. 2 и 3). Линейная зависимость восстановления скорости фиксации CO<sub>2</sub> от концентрации ацетата в присутствии фторацетата указывает на конкурентный характер их взаимодействия (рис. 3). Конкуренция между ацетатом и фторацетатом может осуществляться либо на уровне их транспорта в клетки бактерий, либо в процессе

их метаболизма. В пользу первого предположения свидетельствует тот факт, что пируват, получаемый в результате карбоксилирования экзогенного ацетата в пируватсинтазной реакции (рис. 1, табл. 1), и также другие продукты функционирования цикла Арнона-Бюкенана – 2-оксоглутарат, сукцинат, фумарат, малат, цитрат (данные не показаны) – не восстанавливали фиксации CO<sub>2</sub> в присутствии фторацетата. Конкуренция ацетата и фторацетата за общую транспортную систему приводит к радикальному снижению внутриклеточной концентрации фторацетата, используе-

**Рис. 2.** Действие фторацетата на ассимиляцию бикарбоната.

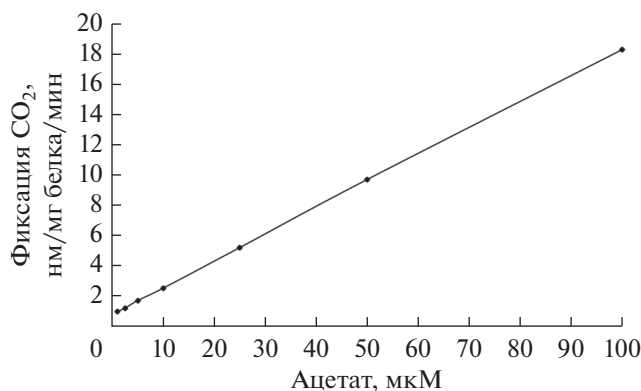


Рис. 3. Снятие ингибирующего действия фторацетата ацетатом.

мого в качестве субстрата для синтеза фторцитрата. В результате полностью блокируется синтез фторцитрата как эндогенного ингибитора аконитазы, и, как следствие, рост бактерий и их способность к автотрофной ассимиляции CO<sub>2</sub> полностью восстанавливаются.

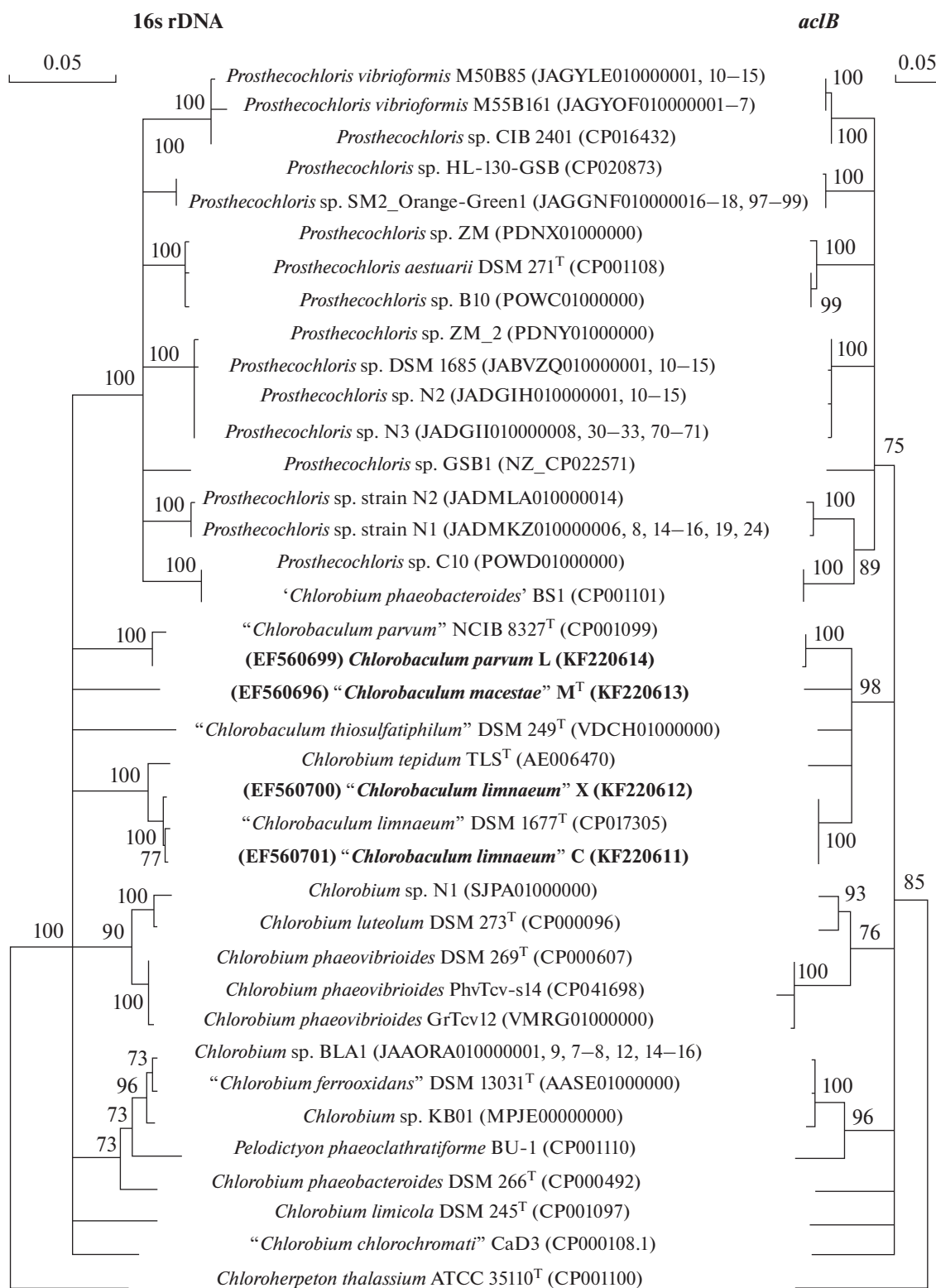
Наличие цитратсинтазы у *Cba. limnaeum* С и ее отсутствие в каноническом варианте цикла Арнона-Бюкенана (рис. 1) послужило мотивом для дополнительных филогенетических исследований гена цитратсинтазы зеленых серных бактерий, принадлежащих к филуму *Chlorobi*.

**Филогенетический анализ генов 16S рРНК, АТФ-цитратлиазы и цитратсинтазы зеленых серных бактерий.** В базе данных PATRIC в настоящее время представлено 655 геномов бактерий филума *Chlorobi*. Однако большинство из них (585 геномов) получено для некультивируемых микроорганизмов в результате анализа метагеномов, поэтому точность идентификации этих микроорганизмов и полнота аннотации их геномов недостаточны для анализа. При этом из оставшихся 70 геномов культивируемых бактерий, только для 38 аннотированы гены 16S рРНК. Эти геномы и были использованы для филогенетического анализа вместе с ранее полученными нами для штаммов зеленых серных бактерий С, Х, L и М (Кеппен и совт., 2008; Турова и соавт., 2013).

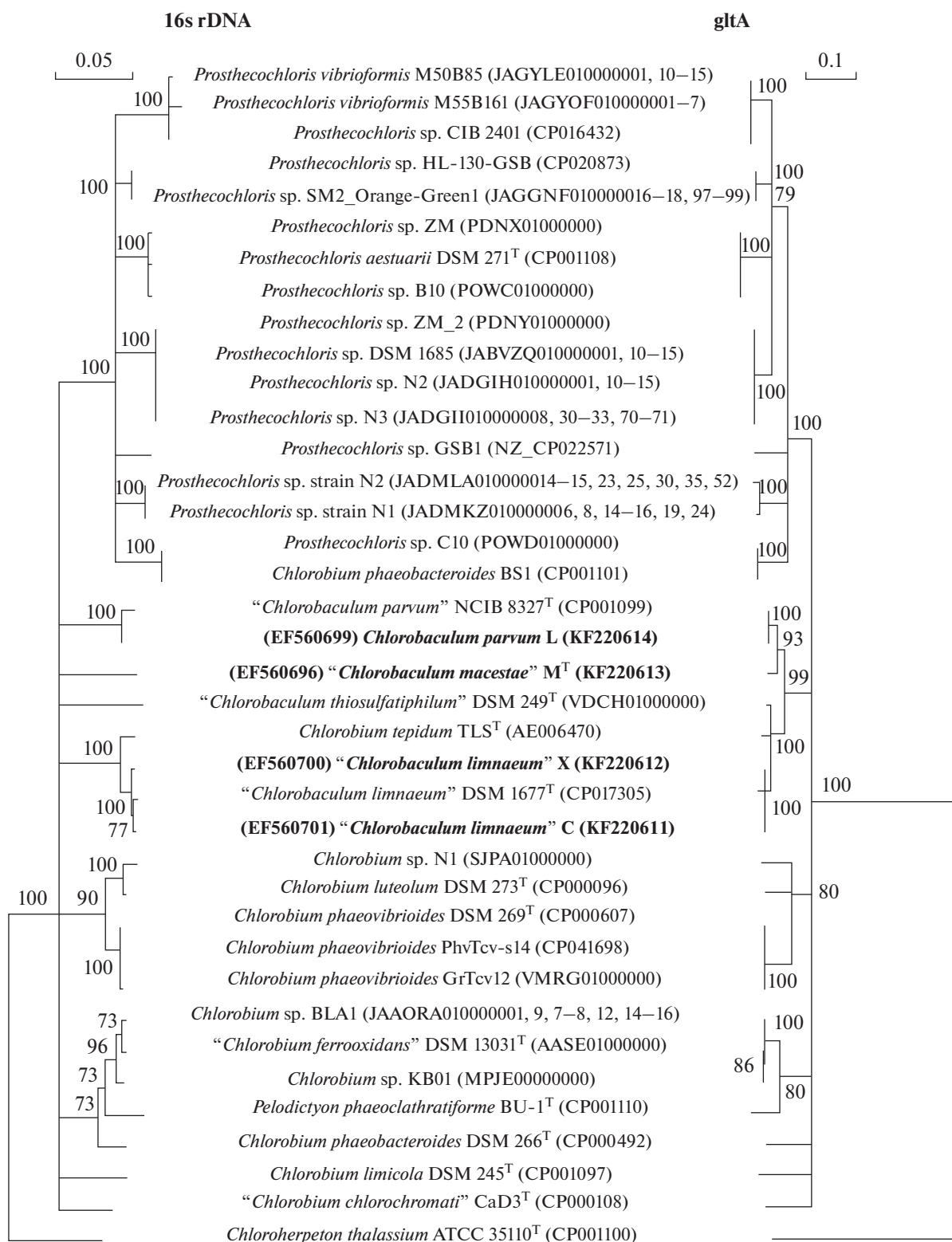
Анализ геномов всех исследованных культивируемых зеленых серных бактерий свидетельствуют о наличии в них не только гена АТФ-цитратлиазы, детерминирующего ключевой фермент цикла Арнона-Бюкенана, но и гена цитратсинтазы, детерминирующего фермент, не участвующий в общепринятом варианте цикла. Для всех анализируемых геномов зеленых серных бактерий было выявлено присутствие как *aclAB* — генов обеих субъединиц АТФ-цитратлиазы, так и генов *gltA* цитратсинтазы (рис. 4 и 5). Топологии филогенетических деревьев, построенных на основании сравнения

аминокислотных последовательностей транслированных генов АТФ-цитратлиазы (*aclB*) и цитратсинтазы (*gltA*) и нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК зеленых серных бактерий, соответствовали родовой структуре семейства *Chlorobiaceae*. При этом положение на филогенетических “АТФ-цитратлиазном” и “цитратсинтазном” деревьях зеленых серных бактерий С, Х, L и М штаммов соответствовало их идентификации на основании анализа генов 16S рРНК как представителей видов *Cba. limnaeum*, *Cba. parvum* и *Cba. macestae*, а топологии всех построенных деревьев в общем виде были конгруэнтны. При этом гены цитратсинтазы у представителей филума *Chlorobi* имеют общее происхождение, а их филогения соответствует таксономической структуре подразделения, основанной на анализе генов 16S рРНК (Alexander et al., 2002; Imhoff, 2003), и, следовательно, их эволюция происходила параллельно эволюции генов 16S рРНК. Коэволюция генов цитратсинтазы штаммов С, Х, L и М с генами 16S рРНК характерна для так называемых “генов домашнего хозяйства” (“housekeeping genes”), т.е. генов, облигатно необходимых для жизнедеятельности данного конкретного филогенетического подразделения, филогения которого также соответствует “рибосомной”. Таким образом, проведенный филогенетический анализ подтверждает необходимость генов цитратсинтазы, также как и генов АТФ-цитратлиазы, для жизнедеятельности зеленых серных бактерий. Принимая во внимание результаты геномного анализа, можно предположить, что у зеленых серных бактерий цитратсинтаза (ЕС 2.3.3.1) включена в систему автотрофной ассимиляции CO<sub>2</sub> как обязательный участник этого процесса.

Обнаружение генов цитратсинтазы во всех исследованных нами геномах зеленых серных бактерий, их коэволюция с генами 16S рРНК, выявление активности этого фермента в клетках штамма С *Cba. limnaeum*, а также невозможность объяснения

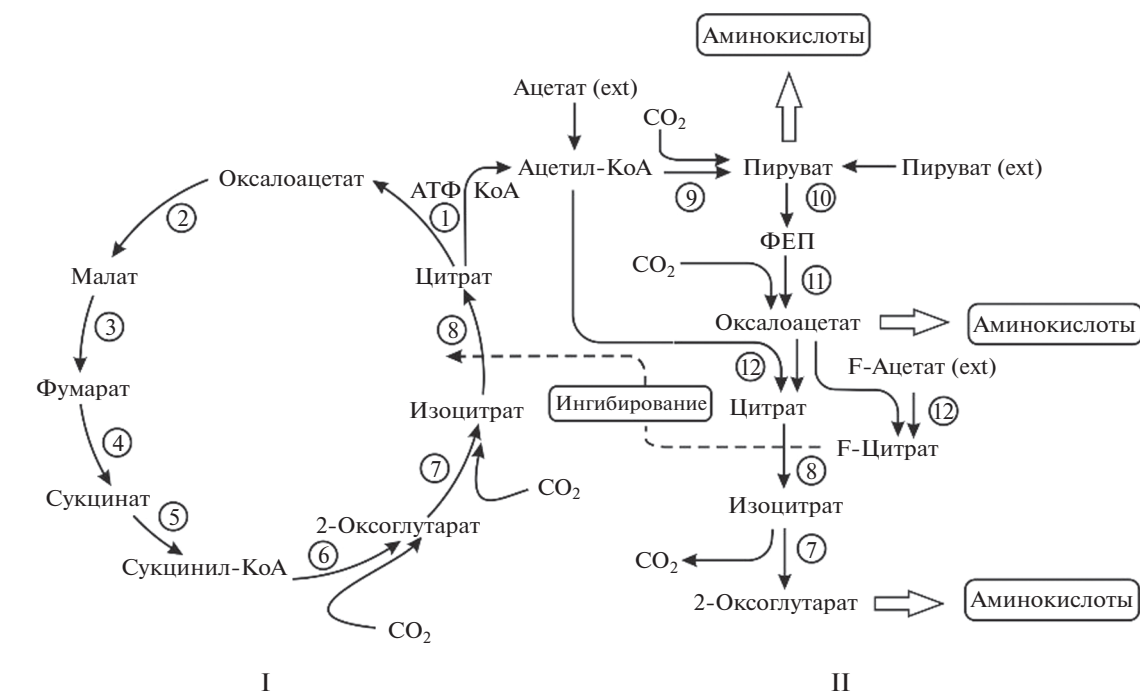


**Рис. 4.** Филогенетические деревья, основанные на сравнении нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и транслированных аминокислотных последовательностей генов АТФ-цитратлиазы (*acfB*) культивируемых зеленых серных бактерий (филум *Chlorobi*). Шкала показывает количество нуклеотидных/аминокислотных замен. Точки ветвления сколлапсированы для значений бутстреп-анализа не превышающих 70%.



**Рис. 5.** Филогенетические деревья, основанные на сравнении нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и транслированных аминокислотных последовательностей генов цитратсинтазы (*gltA*) культивируемых зеленых серных бактерий (филум *Chlorobi*). Шкала показывает количество нуклеотидных/аминокислотных замен. Точки ветвления сколлапсированы для значений бутстреп-анализа не превышающих 70%.





**Рис. 6.** Механизм автотрофной ассимиляции  $\text{CO}_2$  у штамма *Cba. limnaeum*. 1 – АТФ-цитратлиаза; 2 – малатдегидрогеназа; 3 – фумаратгидратаза; 4 – фумаратредуктаза; 5 – сукцинил-КоА синтаза; 6 – ферредоксин-зависимая 2-оксоглутаратсинтаза; 7 – изоцитратдегидрогеназа; 8 – аконитатгидратаза; 9 – ферредоксин-зависимая пируватсинтаза; 10 – пируваткиназа; 11 – ФЕП-карбоксилаза; 12 – цитратсинтаза. I – обращенный цикл трикарбоновых кислот; II – синтез субстратов для построения клетки с использованием ацетил-КоА, синтезированного в обратном ЦТК.

механизма ингибирующего действия фторацетата в рамках канонических представлений (Evans et al., 1966) дали основания предложить новый механизм ассимиляции углекислоты у зеленых серных бактерий (рис. 6).

В соответствии с полученными данными, автотрофная ассимиляция  $\text{CO}_2$  у зеленых серных бактерий происходит при участии двух топологически независимых ферментных комплексов: обращенного цикла трикарбоновых кислот (комплекс I), единственным продуктом активности которого является ацетил-КоА, и нециклического ферментного комплекса ферментов (комплекс II), при участии которого из ацетил-КоА, синтезированного в комплексе I, происходит синтез соединений, необходимых для построения клеток (рис. 6). Цитратсинтаза – фермент, объединяющий комплекс I и комплекс II в единую систему автотрофной ассимиляции  $\text{CO}_2$ , и ацетил-КоА, единственный субстрат, которым обмениваются оба комплекса. Комплекс I включает две реакции карбоксилирования (2-оксоглутаратсинтазу и изоцитратдегидрогеназу), комплекс II – две дополнительные реакции карбоксилирования (пируватсинтазу и ФЕП-карбоксилазу). Синтез 2-оксоглутарата, используемого для синтеза большого числа аминокислот, происходит в результате декарбокси-

лирования изоцитрата, синтезированного внутри комплекса II. Реакция реализуется при участии изоцитратдегидрогеназы, функционирующей в обратном направлении, по сравнению с изоцитратдегидрогеназой в составе комплекса I. В результате этой реакции в энергетический метаболизм бактерий возвращается один восстановительный эквивалент.

Одновременное функционирование ферментных комплексов, имеющих различные функции, но использующих аналогичный (или похожий) набор ферментов возможно только при обеспечении локализации их субстратов внутри комплексов, где они синтезируются. Вопрос о способах такой локализации остается открытым, однако можно предположить, что она может обеспечиваться организацией соответствующих топологически обособленных мультиферментных комплексов. Хотя экспериментальное подтверждение этой гипотезы представляется чрезвычайно сложной задачей, в настоящее время растет количество данных, указывающих на активное вовлечение таких комплексов в метаболизм бактерий (Sweetlove, Fernie, 2018). Объединение ферментов, катализирующих последовательные реакции в метаболических путях, в мультиферментные комплексы может существенно облегчить регуляцию метаболизма, а

также обеспечить эффективное функционирование ферментов, создавая высокие локальные концентрации их субстратов.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят А.В. Лебединского за плодотворную дискуссию в процессе написания статьи.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-54-12031.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кеппен О.И., Турова Т.П., Ивановский Р.Н., Лебедева Н.В., Баслеров Р.В., Берг И.А. Филогенетическое положение трех штаммов зеленых серных бактерий // Микробиология. 2008. Т. 7. С. 282–285.
- Keppen O.I., Tourova T.P., Ivanovsky R.N., Lebedeva N.V., Baslerov R.V., Berg I.A. Phylogenetic position of three strains of green sulfur bacteria // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 243–246.  
<https://doi.org/10.1134/S0026261708020203>
- Турова Т.П., Ковалёва О.Л., Горленко В.М., Ивановский Р.Н. Использование генов ферментов углеродного метаболизма в качестве молекулярных маркеров для представителей филума *Chlorobi* // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 72–77.  
<https://doi.org/10.7868/S0026365614010157>
- Turova T.P., Kovaleva O.L., Gorlenko V.M., Ivanovski R.N. Use of genes of carbon metabolism enzymes as molecular markers of *Chlorobi* phylum representatives // Microbiology (Moscow). 2013. V. 83. P. 784–793.  
<https://doi.org/10.1134/S0026261714010159>
- Alexander B., Andersen J.H., Cox R.P., Imhoff J.F. Phylogeny of green sulfur bacteria on the basis of gene sequences of 16S rRNA and of the Fenna–Matthews–Olson protein // Arch. Microbiol. 2002. V. 178. P. 131–140.  
<https://doi.org/10.1007/s00203-002-0432-4>
- Evans M.C., Buchanan B.B., Arnon D.I. A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1966. V. 55. P. 928–934.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.55.4.928>
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucleic Acids Symposium Series. 1999. V. 41. P. 95–98.
- Hügler M., Sievert S.M. Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean // Annu. Rev. Mar. Sci. 2011. V. 3. P. 261–289.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142712>
- Imhoff J.F. Phylogenetic taxonomy of the family *Chlorobiaceae* on the basis of 16S rRNA and fmo (Fenna–Matthews–Olson protein) gene sequences // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. V. 53. P. 941–951.  
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02403-0>
- Ivanovsky R.N., Krasilnikova E.N., Fal Y.I. A pathway of the autotrophic CO<sub>2</sub> fixation in *Chloroflexus aurantiacus* // Arch. Microbiol. 1993. V. 159. P. 257–264.  
<https://doi.org/10.1007/BF00248481>
- Ivanovsky R.N., Sintsov N.V., Kondratieva E.N. ATP-linked citrate lyase activity in the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola* forma *thiosulfatophilum* // Arch. Microbiol. 1980. V. 128. P. 239–241.  
<https://doi.org/10.1007/BF00406165>
- Larsen H. On the culture and general physiology of the green sulfur bacteria // J. Bacteriol. 1952. V. 64. P. 187–196.  
<https://doi.org/10.1128/jb.64.2.187-196.1952>
- Proudfoot A.T., Bradberry S.M., Vale J.A. Sodium fluoroacetate poisoning // Toxicol. Rev. 2006. V. 25. P. 213–219.  
<https://doi.org/10.2165/00139709-200625040-00002>
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 406–425.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sirevag R., Ormerod J.G. Carbon dioxide-fixation in photosynthetic green sulfur bacteria // Science. 1970. V. 169. P. 186–188.  
<https://doi.org/10.1126/science.169.3941.186>
- Sweetlove L.J., Fernie A.R. The role of dynamic enzyme assemblies and substrate channelling in metabolic regulation // Nature Commun. 2018. V. 9. P. 2136.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04543-8>
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 4673–4680.  
<https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Trueper 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.  
<https://doi.org/10.1007/bf02046728>
- Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Comput. Appl. Biosci. 1994. V. 10. P. 569–570.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/10.5.569>
- Villafranca J.J., Platus E. Fluorocitrate inhibition of aconitase. Reversibility of the inactivation // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1973. V. 55. P. 1197–1207.  
[https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(73\)80021-x](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(73)80021-x)

## A New Approach to the Mechanism of Autotrophic CO<sub>2</sub> Assimilation in Green Sulfur Bacteria

R. N. Ivanovsky<sup>1, \*</sup>, N. V. Lebedeva<sup>1</sup>, and T. P. Tourova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Moscow State University, Moscow, 119191 Russia

<sup>2</sup>Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: mguru@mail.ru

Received January 19, 2022; revised January 25, 2022; accepted January 25, 2022

**Abstract**—The autotrophic system of CO<sub>2</sub> fixation in *Chlorobaculum limnaeum* strain C consists of two topologically independent enzyme complexes: the reverse tricarboxylic acid cycle (complex I) with acetyl-CoA as the only product, and a noncyclic complex of reactions (complex II). The reactions catalyzed by the complex II enzymes use acetyl-CoA synthesized in the reverse TCA cycle to synthesize all the substrates required for biomass synthesis. Complex I includes two carboxylation reactions catalyzed by pyruvate synthase and PEP carboxylase. Complex II includes two additional carboxylation reactions, which are catalyzed by 2-oxoglutarate synthase and isocitrate dehydrogenase. The enzyme complexes I and II are united into a system of autotrophic CO<sub>2</sub> assimilation by citrate synthase, which is not present in the classical variant of the Arnon-Buchanan cycle. The citrate synthase gene was detected in all studied green sulfur bacteria and may be considered to be among the housekeeping genes.

**Keywords:** green sulfur bacteria, reverse tricarboxylic acid cycle, autotrophic CO<sub>2</sub> assimilation