



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 579.222

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11871

### Обнаружение способности к диссимиляционной тиосульфатредукции у представителей бесцветных серобактерий рода *Thiothrix* с использованием РНК, выделенной методом сорбции

Дмитрий Денисович Смольяков, Александра Сергеевна Алёмова,  
Татьяна Сергеевна Руденко, Маргарита Юрьевна Грабович<sup>✉</sup>

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, margarita\_grabov@mail.ru<sup>✉</sup>

**Аннотация.** Впервые для представителей нитчатых бесцветных серобактерий рода *Thiothrix*, таких как *T. litoralis* AS<sup>T</sup>, *T. unzii* A1<sup>T</sup> и *T. nivea* JP2<sup>T</sup>, была обнаружена способность к анаэробному дыханию с использованием тиосульфата в качестве терминального акцептора электронов. Ранее для этих бактерий была показана способность к литотрофному росту в присутствии тиосульфата в качестве донора электронов для энергетического метаболизма.

Для установления механизма восстановления тиосульфата при анаэробном росте, участие тиосульфатредуктазы или диспропорционирование тиосульфата, был проведен анализ конечных продуктов его превращения. У всех исследованных представителей рода *Thiothrix* были выявлены продукты, образующиеся при превращении тиосульфата, сульфит и сульфид, характерные при функционировании тиосульфатредуктазы, тогда как продукты, характерные для процесса диспропорционирования тиосульфата (сульфат и сульфид), не были выявлены.

В ходе исследования были идентифицированы гены *phsA*, *phsB* и *phsC*, кодирующие тиосульфатредуктазу (хинон, КФ 1.8.5.5), показана экспрессия этих генов в анаэробных условиях. Установлено, что при анаэробном росте на тиосульфате по сравнению с аэробным культивированием экспрессия генов *phsA*, *phsB*, *phsC* у *T. litoralis* AS<sup>T</sup>, *T. unzii* A1<sup>T</sup> и *T. nivea* JP2<sup>T</sup> в первом пассаже увеличивается в 6-15 раз, тогда как во втором пассаже у *T. unzii* A1<sup>T</sup> наблюдается многократное увеличение экспрессии генов в среднем в 180 раз. Для экстракции суммарной РНК использовались сорбирующие колонки. Образцы гомогенизировались и лизировались в присутствии хаотропной соли, а затем наносились на спин-колонку, отмывались от загрязнений. Удаление примесей ДНК и получение чистой РНК проводили, подвергая образец обработке ДНКазой непосредственно на спин-колонке. Качество РНК оценивали электрофорезом не менее 2% агарозном геле с добавлением 2.2. М раствора формальдегида.

В сероводородных биотопах, где спорадически создаются анаэробные условия, представители рода *Thiothrix*, ведущие прикрепленный образ жизни, для выживания в резко меняющихся условиях вынуждены переходить с аэробного дыхания на анаэробное. Невысокий урожай клеток *T. litoralis* AS<sup>T</sup>, *T. unzii* A1<sup>T</sup> и *T. nivea* JP2<sup>T</sup> (15 мг/дм<sup>3</sup>) при анаэробном росте на тиосульфате указывает, что процесс анаэробного дыхания на тиосульфате носит характер поддерживающего метаболизма.

Полученные данные позволяют приблизиться к разгадке, каким образом литотрофные серобактерии рода *Thiothrix*, ведущие прикрепленный образ жизни, эффективно используют тиосульфат в своей метаболической стратегии, приспособившись к изменяющимся условиям среды, и объясняют их доминирующее положение в проточных сероводородных биотопах.

**Ключевые слова:** *Thiothrix litoralis*, *Thiothrix unzii*, *Thiothrix nivea*, анаэробное дыхание, тиосульфатредуктаза, *phsABC*

**Благодарности:** исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00137, М.Ю.Г. (<https://rscf.ru/en/project/20-14-00137/>, дата соглашения 15 мая 2023 г.)).

**Для цитирования:** Смольяков Д.Д., Алёмова А.С., Руденко Т.С., Грабович М.Ю. Обнаружение способности к диссимиляционной тиосульфатредукции у представителей бесцветных серобактерий рода *Thiothrix* с использованием РНК, выделенной методом сорбции // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023. Т. 23, № 6. С. 1103-1112. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11871>



Original article

## Detection of the ability to dissimilate sulfate reduction in representatives of colorless sulfur bacteria of the genus *Thiothrix* using RNA isolated by sorption

Dmitry D. Smolyakov, Aleksandra S. Alyomova,  
Tatyana S. Rudenko, Margarita Yu. Grabovich<sup>✉</sup>

Voronezh State University, Voronezh, Russia, margarita\_grabov@mail.ru<sup>✉</sup>

**Annotation.** For the first time, the ability to anaerobic respiration using thiosulfate as a terminal electron acceptor was discovered for representatives of filamentous colorless sulfur bacteria of the genus *Thiothrix*, such as *T. litoralis* AS<sup>T</sup>, *T. unzii* A1<sup>T</sup> and *T. nivea* JP2<sup>T</sup>. Previously, the ability to lithotrophic growth in the presence of thiosulfate as an electron donor for energy metabolism was shown for these bacteria.

To establish the mechanism of thiosulfate reduction during anaerobic growth, the participation of thiosulfate reductase or the disproportionation of thiosulfate, an analysis of the end products of its transformation was carried out. In all studied representatives of the genus *Thiothrix*, products formed during the conversion of thiosulfate, sulfite and sulfide, characteristic of the functioning of thiosulfate reductase, were identified, whereas products characteristic of the process of thiosulfate disproportionation (sulfate and sulfide) were not identified.

During the study, the genes *phsA*, *phsB* and *phsC* encoding thiosulfate reductase (quinone, EC 1.8.5.5) were identified, and the expression of these genes under anaerobic conditions was shown. It was found that during anaerobic growth on thiosulfate, compared with aerobic cultivation, the expression of the *phsA*, *phsB*, *phsC* genes in *T. litoralis* AS<sup>T</sup>, *T. unzii* A1<sup>T</sup> and *T. nivea* JP2<sup>T</sup> in the first passage increases by 6-15 times, whereas in the second passage in *T. unzii* A1<sup>T</sup> there is a multiple increase in gene expression on average by 180 time. Sorbing columns were used to extract the total RNA. The samples were homogenized and lysed in the presence of a chaotropic salt, and then applied to a spin column, washed from contamination. DNA impurities were removed and pure RNA was obtained by subjecting the sample to DNase treatment directly on the spin column. The RNA quality was assessed by electrophoresis of at least 2% agarose gel with the addition of 2.2 M formaldehyde solution.

In hydrogen sulfide biotopes, where anaerobic conditions are sporadically created, representatives of the genus *Thiothrix*, leading an attached lifestyle, need to switch from aerobic to anaerobic respiration to survive in dramatically changing conditions. The low yield of *T. litoralis* AS<sup>T</sup>, *T. unzii* A1<sup>T</sup> and *T. nivea* JP2<sup>T</sup> cells (15 mg/dm<sup>3</sup>) during anaerobic growth on thiosulfate indicates that the process of anaerobic respiration on thiosulfate has the character of a supportive metabolism.

The data obtained allow us to approach the solution of how lithotrophic sulfur bacteria of the genus *Thiothrix*, leading an attached lifestyle, effectively use thiosulfate in their metabolic strategy, adapting to changing environmental conditions, and explain their dominant position in flowing hydrogen sulfide biotopes.

**Keywords:** *Thiothrix litoralis*, *Thiothrix unzii*, *Thiothrix nivea*, anaerobic respiration, thiosulfate reductase, *phsABC*

**Acknowledgments:** the study received financial support from the Russian Science Foundation, project no. 20-14-00137.

**For citation:** Smolyakov D.D., Alyomova A.S., Rudenko T.S., Grabovich M.Y. Detection of the ability to dissimilate sulfate reduction in representatives of colorless sulfur bacteria of the genus *Thiothrix* using RNA isolated by sorption. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(6): 1103-1112. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11871>

### Введение

Многие прокариоты характеризуются наличием разнообразных систем диссимиляционного взаимопревращения серных соединений и могут использовать их в качестве источников энергии для роста.

Такими соединениями являются сероводород, элементная сера, сульфит, тетраионат, тиосульфат и др. [1]. Тиосульфат является важным промежуточным звеном в круговороте серных соединений и

бактерии могут использовать его как донор или акцептор электронов в энергетическом метаболизме [2].

Род *Thiothrix* представлен классическими литотрофами, способными окислять целый ряд восстановленных соединений серы. Они ведут прикрепленный образ жизни и формируют обильные образования как в природных сероводородных биотопах, так и в антропогенных системах очистных сооружений или биореакторах по удалению фосфора [3].

Окисление тиосульфата у представителей рода *Thiothrix* осуществляется при участии разветвленной Sox-системы и сопровождается образованием сульфата и запасанием внутриклеточных включений элементной серы. Таким образом у бактерий рода реализуется процесс литотрофного роста, когда тиосульфат выступает в качестве донора электронов для энергетического метаболизма [4]. Однако о возможности использования тиосульфата в качестве акцептора электронов ранее не было заявлено для рода *Thiothrix*. Хотя для сероводородных источников характерна постоянная смена концентрации кислорода, что предполагает создание анаэробных условий. В процессе диссимиляционной тиосульфатредукции, тиосульфат может выполнять роль акцептора электронов при анаэробном дыхании, в котором подвергается восстановлению до сульфита и сульфида [1].

Основным направлением данной работы является изучение анаэробного роста представителей рода *Thiothrix* с использованием тиосульфата в качестве терминального акцептора электронов.

### Экспериментальная часть

**Культивирование.** Объектом исследования служили штаммы *T. litoralis* AS<sup>T</sup>, *T. unzii* A1<sup>T</sup>, *T. nivea* JP2<sup>T</sup>. Штаммы культивировали в среде Амбрустера следующего состава (г/л): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0.5; CaCl<sub>2</sub> – 0.03; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.01; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0.022; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0.035; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0.05 [5]. Перед посевом в

1 дм<sup>3</sup> среды в виде стерильных растворов добавляли по 1 см<sup>3</sup> микроэлементов и витаминов [6].

Для анаэробного культивирования использовали флаконы емкостью 0.1 дм<sup>3</sup> с прокладками из полибутиловой резины и завинчивающимися металлическими крышками, которые полностью заполняли свежеприготовленной стерильной прокипяченной средой вышеописанного состава с добавлением 1.5 г/дм<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O в качестве терминального акцептора электронов и 0.5 г/дм<sup>3</sup> лактата натрия, и 0.5 г/дм<sup>3</sup> ацетат натрия в качестве доноров электронов. pH среды 7.5. Культуры инкубировали при 27°C. Проводилось 3 последовательных пассажа культур.

Создание анаэробных условий достигалось вытеснением воздуха из среды пятью объемами аргона [7]. Газовая фаза стерилизовалась с использованием бактериальных фильтров (Millipore, 0.2 мкм) [8].

В качестве контроля бактерии культивировали аэробно в среде вышеописанного состава; перед посевом в среду дополнительно вносили Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1 г/дм<sup>3</sup>; лактат натрия, 0.25 г/дм<sup>3</sup> и ацетат натрия, 0.25 г/дм<sup>3</sup>. pH среды 7.5. Культуры инкубировали при 27°C. Проводилось 3 последовательных пассажа культур.

**Анализ экспрессии генов.** Для экстракции суммарной РНК использовался набор PureLink®RNAMiniKit (Invitrogen, США) с сорбирующими микроколонками. Процедура осуществлялась с использованием спин-колонок: образцы были гомогенизированы и лизированы в присутствии хаотропной соли, затем нанесены на спин-колону, отмыты от загрязнений и чистая РНК была элюирована в соответствии с протоколом производителя. Для удаления примесей ДНК и получения чистой РНК, образец подвергался обработке ДНКазой непосредственно на спин-

Таблица 1. Праймеры для определения экспрессии генов *phsA*, *phsB*, *phsC*, кодирующих тиосульфатредуктазу

Table 1. Primers for determining the expression of *phsA*, *phsB*, and *phsC* genes encoding thiosulfate reductase

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность
16S рРНК	AS16S F	5'-ATCTTCGGATTTCAGTGGCGG-3'
	AS16S R	5'-CGTAGGGCGTATGCGGTATT-3'
	JP2 16S F	5'-TGCACCAGAAGCAGGTAGTC-3'
	JP2 16S R	5'-GACTTCACCCCAGTCATCGG-3'
	A116S F	5'-AATACCGCATACGCCCTACG-3'
	A116S R	5'-AGATCGTCGCCTTGGTAAGC-3'
<i>phsA</i>	AS <i>phsA</i> F	5'-AGTCAGTCTTCCCGACTCCA-3'
	AS <i>phsA</i> R	5'-CTCCCACTCAATCGCGTCTT-3'
	JP2 <i>phsA</i> F	5'-GACGCGATTGAGTGGGAAGA-3'
	JP2 <i>phsA</i> R	5'-TGGGTGTGGAAACCGATACG-3'
	A1 <i>phsA</i> F	5'-CTGGCGGCAATGGTTTTACC-3'
	A1 <i>phsA</i> R	5'-TCATTGGGACTCACGTCTGC-3'
<i>phsB</i>	AS <i>phsB</i> F	5'-TTACTACACCGCTGGCAAGG-3'
	AS <i>phsB</i> R	5'-ATCGTACCGAGCGGATTAC-3'
	JP2 <i>phsB</i> F	5'-CCAGCCACGTATCGACCAAG-3'
	JP2 <i>phsB</i> R	5'-TTGGCGTCACCGAAGATCAG-3'
	A1 <i>phsB</i> F	5'-GTCAATATCGGCCCAACCA-3'
	A1 <i>phsB</i> R	5'-CGGACAAATGCCGCTCATTC-3'
<i>phsC</i>	AS <i>phsC</i> F	5'-ACAATGAAGTCGGGTGAGGC-3'
	AS <i>phsC</i> R	5'-GCAACTCCGCATACCACAAC-3'
	JP2 <i>phsC</i> F	5'-CTGGCGTTTTTCAGCGACAAG-3'
	JP2 <i>phsC</i> R	5'-AGTAGATATGCGCCACCAGC-3'
	A1 <i>phsC</i> F	5'-CGCTGGA AACCATGAAGTCG-3'
	A1 <i>phsC</i> R	5'-AACTCCGCATACCACAAGGG-3'

колонке. Качество РНК оценивали электрофорезом на 2% агарозном геле с добавлением 2.2 М формальдегида. Концентрацию РНК измеряли с использованием набора для анализа РНК HS Qubit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) на флуорометре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Затем 1000 нг РНК подвергали обратной транскрипции с использованием М-MuLV (СибЭнзим, Москва, Россия) согласно протоколу производителя. Количественную ОТ-ПЦР проводили с использованием SYBR Green I на системе реального времени Bio-Rad CFX96TM (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) [9].

Для нахождения оптимальных условий амплификации использовали температурный градиент. Окончательная программа включала 95°C, 5' + [(95°, 15" + 59°C, 20" + 72°C, 15") × 39]. Фрагменты генов *phsA*, *phsB* и *phsC*, кодирующих

субъединицы тиосульфатредуктазы у *T. litoralis* AS, *T. nivea* JP2 и *T. unzii* A1, амплифицировали с использованием праймеров, приведенных в таблице 1; все праймеры были разработаны с помощью PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) (табл. 1).

**Аналитические методы.** Определение  $S_2O_3^{2-}$ ,  $SO_3^{2-}$ ,  $HS^-$  при их одновременном присутствии в среде проводили методом отдельного йодометрического титрования [10];  $H_2S$  предварительно фиксировали 10% ацетатом цинка [11]. Количество белка определяли с помощью метода Лоури [12].

**Биоинформатический анализ.** Поиск генов *phsA*, *phsB* и *phsC* и их аннотацию проводили с помощью RAST-сервера 2 с последующей ручной коррекцией аннотации путем сравнения предсказанных последовательностей белков с базами данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) [13].

Таблица 2. Белки тиосульфатредуктазы, закодированные в геномах представителей рода *Thiothrix*

Table 2. Thiosulfate reductase proteins encoded in the genomes of members of the genus *Thiothrix*

Вид	GeneBank ID белка PhsA	GeneBank ID белка PhsB	GeneBank ID белка PhsC
<i>T. litoralis</i> AS <sup>T</sup>	WP 210223455.1	WP 210223479.1	WP 200444099.1
<i>T. nivea</i> JP2 <sup>T</sup>	WP 002709898.1	WP 002709899.1	WP 200444099.1
<i>T. unzii</i> A1 <sup>T</sup>	WP 210217653.1	WP 210223479.1	WP 200444099.1
<i>Thiothrix</i> sp. 207	MBU0654562.1	MBU0654561.1	MBU0654560.1
<i>T. caldifontis</i> G1 <sup>T</sup>	WP 093069284.1	WP 093069286	WP 093069287.1
<i>Candidatus Thiothrix anitrata</i> A52	WP_210226365.1	WP_210226366.1	WP_210226367.1
<i>T. lacustris</i> BL <sup>T</sup>	WP 038140930.1	WP 028488830.1	WP 028488831.1
<i>T. subterranea</i> Ku5 <sup>T</sup>	WP 202716885.1	WP 202716886.1	WP 202716887.1
<i>T. fructosivorans</i> Q <sup>T</sup>	WP_242632690	WP_207249534.1	WP_207249535.1

N-концевые сигнальные пептиды были предсказаны с помощью Signal P v.5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0> (по состоянию на 10 августа 2023 г.)), а наличие трансмембранных спиралей было предсказано с помощью ТМНММ v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ТМНММ/> (по состоянию на 15 сентября 2023 г.)).

Филогенетические деревья построены методом минимальной эволюции и методом присоединения соседей с помощью программного обеспечения MEGA11 [14].

### Обсуждение результатов

Тиосульфатредуктаза фермент из класса молибдоптеринных оксидоредуктаз, состоящий из трех субъединиц (PhsABC), кодируемых тремя генами [15]. Каталитическая субъединица PhsA содержит N-концевой сигнальный пептид Tat, что указывает на его расположение на внешней стороне мембраны. Такие комплексы могут быть ответственны за восстановление различных акцепторов электронов, в том числе тиосульфата, тетратионата, нитрата и арсената [16].

Для подтверждения способности бактерий рода *Thiothrix* к анаэробному росту в присутствии тиосульфата в качестве акцептора электронов был проведен биоинформатический анализ генома с целью

поиска последовательностей, кодирующих тиосульфатредуктазу.

Аннотация позволила выявить потенциальные гены, кодирующие тиосульфатредуктазу, во всех проанализированных геномах *Thiothrix* spp., что косвенно указывает на их способность к диссимиляционной тиосульфатредукции (табл. 2). На рисунке 1 приведена схема оперона *phsABC* у видов *T. litoralis*, *T. unzii* и *T. nivea*, представляющих разные кластеры на филогенетическом дереве рода *Thiothrix*.

Поскольку тиосульфатредуктаза относится к классу молибдоптеринных оксидоредуктаз, это значительно усложняет идентификацию данного белка [18, 19]. Для выяснения функций молибдоптеринных оксидоредуктаз был проведен филогенетический анализ на основе ранее функционально характеризованных последовательностей оксидоредуктаз. Филогенетический анализ показал четкую кластеризацию выведенных последовательностей из исследованных нами прокариот с ранее охарактеризованными тиосульфатредуктазами. Однако последовательности, обнаруженные в геномах *Thiothrix winogradskyi* СТЗ<sup>T</sup> и *Ca. Thiothrix moscovensis* RT филогенетически удалены от охарактеризованных тиосульфатредуктаз (рис. 2).

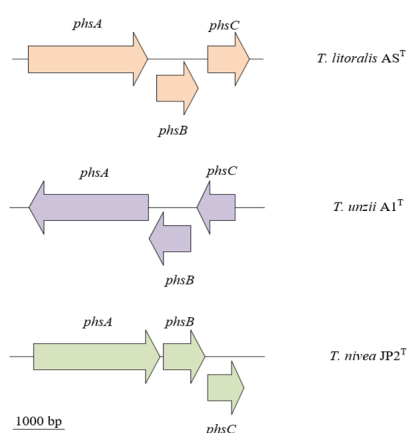


Рис. 1. Организация генов тиосульфатредуктазы, кодирующих каталитическую субъединицу (*phsA*), 4Fe-4S связывающий белок (*phsB*), якорную субъединицу (*phsC*), несущую функцию закрепления фермента в мембране [17]

Fig. 1. Organization of thiosulfate reductase genes encoding catalytic subunit (*phsA*), 4Fe-4S binding protein (*phsB*), anchoring subunit (*phsC*), which has the function of anchoring the enzyme in the membrane [17]

Анализ выявил, что потенциальная тиосульфатредуктаза присутствует у всех представителей рода *Thiothrix*: *T. fructosivorans* Q<sup>T</sup>, *T. caldifontis* G1<sup>T</sup>, *T. lacustris* BL<sup>T</sup>, *T. litoralis* AS<sup>T</sup>, *T. nivea* JP2<sup>T</sup>, *T. unzii* A1<sup>T</sup>, *Thiothrix* sp. 207, *Ca. Thiothrix anitrata* A52, *T. subterranea* Ku-5<sup>T</sup>, *Ca. Thiothrix sulfatifontis* КТ. Высокое сходство полученных аминокислотных последовательностей PhsA (>80%) всех

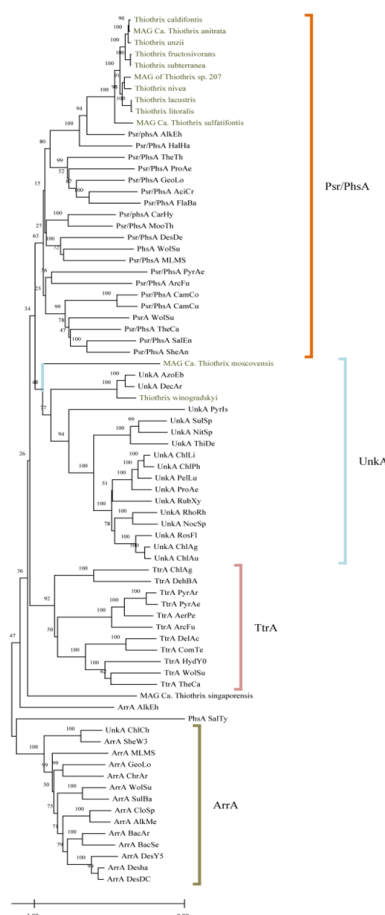


Рис. 2. Филогенетическое дерево, показывающее кластеризацию выведенных аминокислотных последовательностей, предположительно тиосульфатредуктаз, из *Thiothrix* spp. Оранжевой рамкой заключены последовательности охарактеризованных тиосульфатредуктаз. Выведенные последовательности из *Thiothrix* spp. обозначены зеленым цветом.

Fig. 2. Phylogenetic tree showing clustering of deduced amino acid sequences, presumably thiosulfate reductases from *Thiothrix* spp.. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11 [14]. Sequences of characterized thiosulfate reductases are enclosed in an orange box. The deduced sequences from *Thiothrix* spp. are indicated in green.

видов, кроме *Ca. Thiothrix moscovensis* и *T. winogradskyi*, скорее всего указывает на потерю генов *phsABC*.

Для верификации геномных данных и экспериментального подтверждения способности бактерий рода *Thiothrix* к анаэробному росту в присутствии тиосульфата в качестве терминального акцептора электронов было проведено измерение

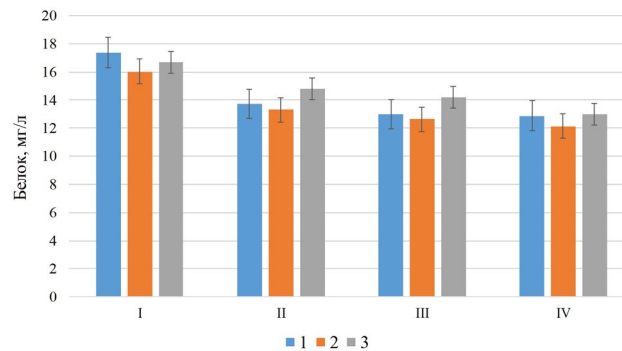


Рис. 3. Прирост белка в присутствии тиосульфата в качестве акцептора электронов при анаэробном росте в момент экспоненциальной фазы роста в I, II и III пассаже у *T. litoralis* AS<sup>T</sup> (1), *T. unzii* A1<sup>T</sup> (2), *T. nivea* JP2<sup>T</sup> (3)

Fig. 3. Protein gain in the presence of thiosulfate as an electron acceptor during anaerobic growth during the exponential growth phase in *T. litoralis* AS<sup>T</sup> (1), *T. unzii* A1<sup>T</sup> (2), and *T. nivea* JP2<sup>T</sup> (3) in the I, II and III passages

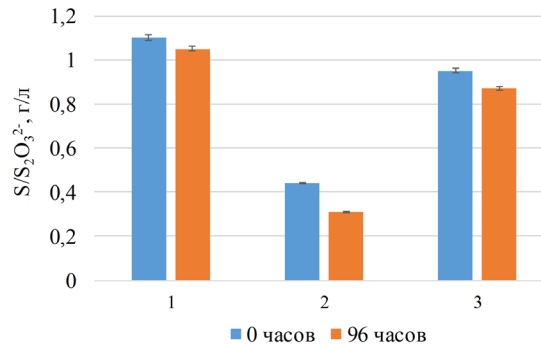


Рис. 4. Концентрация тиосульфата при анаэробном росте в нулевой точке (0 часов) и конечной точке после 96 часов роста *T. litoralis* AS<sup>T</sup> (1), *T. unzii* A1<sup>T</sup> (2) и *T. nivea* JP2<sup>T</sup> (3)

Fig. 4. Thiosulfate concentration during anaerobic growth at zero point (0 hours) and end point after 96 hours of growth of *T. litoralis* AS<sup>T</sup> (1), *T. unzii* A1<sup>T</sup> (2), and *T. nivea* JP2<sup>T</sup> (3)

общего количества белка в момент экспоненциальной фазы роста в I, II и III пассаже. Для *T. litoralis* AS<sup>T</sup>, *T. unzii* A1<sup>T</sup>, *T. nivea* JP2<sup>T</sup> показан стабильный прирост белка в среднем 15 мг/дм<sup>3</sup> (рис. 3). Для *Thiothrix winogradskyi* не показано анаэробного роста на тиосульфате в качестве конечного акцептора электронов.

В процессе работы была исследована динамика восстановления тиосульфата и образования продуктов его восстановления при анаэробном росте методом йодометрического титрования, в ходе которого мы показали убыль тиосульфата спустя 96 часов роста по сравнению с исходной концентрацией: у *T. litoralis* AS<sup>T</sup> концентрация уменьшилась на 0.05 г/дм<sup>3</sup>, *T. unzii* A1<sup>T</sup> – на 0.13 г/дм<sup>3</sup>, *T. nivea* JP2<sup>T</sup> –

на 0.08 г/дм<sup>3</sup> (рис. 4). Этот процесс катализирует тиосульфатредуктаза, которая восстанавливает тиосульфат с образованием конечных продуктов сульфита и сульфида. Важно отметить, что такая реакция отличается от реакции диспропорционирования тиосульфата, при котором продуктами являются сульфат и сероводород [19]. В ходе работы было показано увеличение концентрации сульфита (S/SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) и сульфида (S/HS<sup>-</sup>): у *T. litoralis* AS<sup>T</sup> – на 0.017 и 0.057 г/дм<sup>3</sup>, *T. unzii* A1<sup>T</sup> – на 0.025 и 0.012 г/дм<sup>3</sup>, *T. nivea* JP2<sup>T</sup> – на 0.013 и 0.057 г/л, соответственно (рис. 5).

Дополнительно у *T. litoralis*, *T. unzii*, *T. nivea* исследован уровень экспрессии генов *phsA*, *phsB*, *phsC* в анаэробных условиях и аэробных условиях в качестве контроля. В результате было показано, что

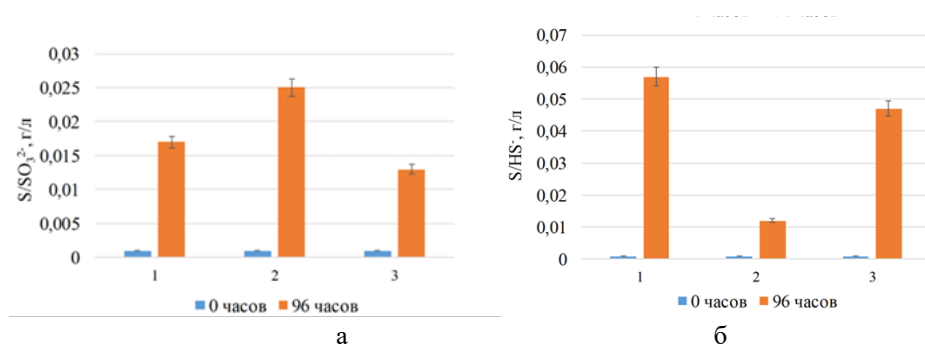


Рис. 5. Концентрация продуктов превращения тиосульфата  $S/SO_3^{2-}$  (А) и  $S/HS^-$  (Б) при анаэробном росте в нулевой точке (0 часов) и конечной точке после 96 часов роста *T. litoralis* AS<sup>T</sup> (1), *T. unzii* A1<sup>T</sup> (2), *T. nivea* JP2<sup>T</sup> (3)

Fig. 5. Concentration of thiosulfate conversion products  $S/SO_3^{2-}$  (A) and  $S/HS^-$  (B) during anaerobic growth at zero point (0 h) and end point after 96 h of growth of *T. litoralis* AS<sup>T</sup> (1), *T. unzii* A1<sup>T</sup> (2), and *T. nivea* JP2<sup>T</sup> (3)

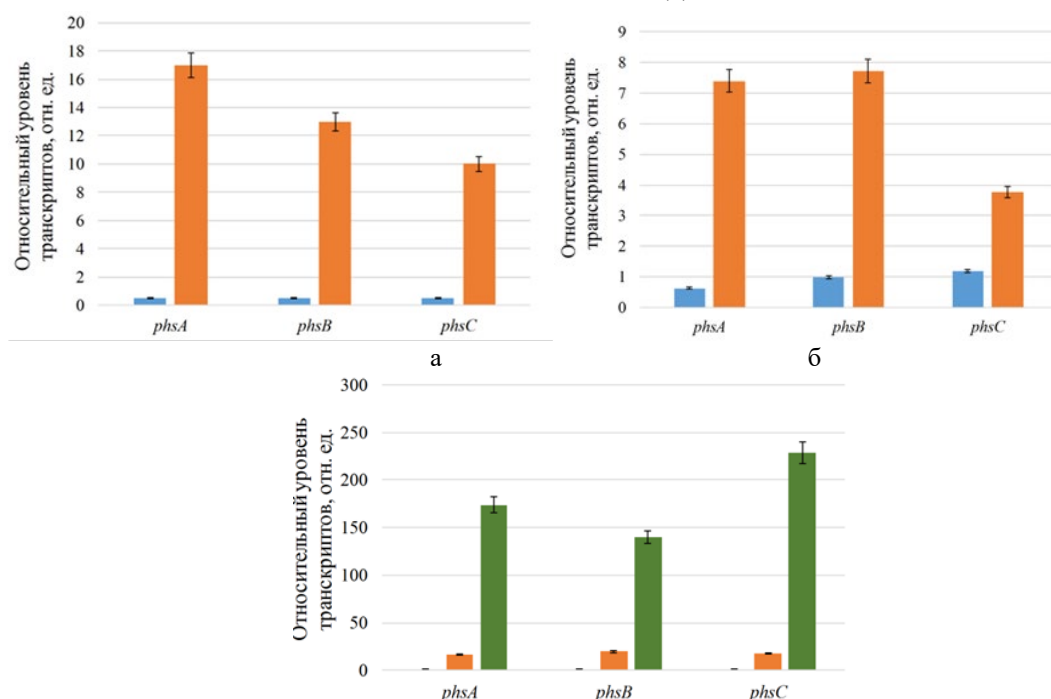


Рис. 6. Экспрессия генов *phsA*, *phsB* и *phsC*, кодирующих тиосульфатредуктазу, из *T. litoralis* AS<sup>T</sup> (А), *T. nivea* JP2<sup>T</sup> (Б) и *T. unzii* A1<sup>T</sup> (В) при аэробном росте и анаэробном росте в присутствии тиосульфата в качестве терминального акцептора электронов. Голубым цветом обозначен аэробный рост, оранжевым цветом — анаэробный рост I пассажа, зеленым цветом — анаэробный рост II пассажа

Fig. 6. Expression of *phsA*, *phsB*, and *phsC* genes encoding thiosulfate reductase from *T. litoralis* AS<sup>T</sup> (A), *T. nivea* JP2<sup>T</sup> (Б), and *T. unzii* A1<sup>T</sup> (В) during aerobic growth and anaerobic growth in the presence of thiosulfate as a terminal electron acceptor. Blue color indicates aerobic growth, orange color indicates anaerobic growth of passage I, and green color indicates anaerobic growth of passage II

при анаэробном росте на тиосульфате экспрессия генов *phsA*, *phsB*, *phsC* у *T. litoralis* AS<sup>T</sup> увеличивается приблизительно в 15 раз по сравнению с аэробным культивированием (рис. 6А). У *T. nivea* JP2<sup>T</sup> уровень экспрессии генов тиосульфатредуктазы увеличивается в среднем в

6 раз (рис. 6Б). У *T. unzii* A1<sup>T</sup> экспрессия генов в первом пассаже возрастает примерно в 12 раз по сравнению с аэробным культивированием, во втором пассаже наблюдается многократное увеличение экспрессии генов в среднем в 180 раз (рис. 6В).





Таким образом, стабильный прирост белка у *Thiothrix* spp. в течение трех последовательных пассажей в присутствии тиосульфата в качестве терминального акцептора электронов при анаэробном росте с образованием пропорционального увеличения концентрации сульфида и сульфита, как конечных продуктов реакции восстановления тиосульфата, а также значительное увеличение уровня экспрессии генов, кодирующих тиосульфатредуктазу, при анаэробном росте в совокупности указывает на наличие активности тиосульфатредуктазы у представителей рода *Thiothrix*.

### Заключение

С помощью молекулярных и биохимических методов была обнаружена способность представителей рода *Thiothrix*, *T. litoralis* AS<sup>T</sup>, *T. unzii* A1<sup>T</sup>, *T. nivea* JP2<sup>T</sup>, к анаэробному росту в присутствии тиосульфата в качестве терминального акцептора электронов. Изучение процесса тиосульфатредукции даст возможность

### Список литературы/References

1. Aketagawa J., Kobayashi K., Ishimoto M., Purification and properties of thiosulfate reductase from *Desulfovibrio vulgaris*, *J. Biochem.*, 1985; 97 (4): 1025-1032. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135144>.
2. Kuznetsov S.I., Dubinina G.A., Methods of investigation of aqueous microorganisms, *Nauka.*, 1989; 285. (In Russ.)
3. Ravin N.V., Rudenko T.S., Smolyakov D.D., Beletsky A.V., Gureeva M.V., Samylina O.S., Grabovich M.Y., History of the study of the genus *Thiothrix*: from the first enrichment cultures to pangenomic analysis, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022; 23(17): 9531. <https://doi.org/10.3390/ijms23179531>
4. Grabovich, M.Y., Ravin, N.V., Boden, R. *Thiothrix*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2023; 21. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01229.pub2>
5. Armbruster E.H., Improved technique for isolation and identification of *Sphaerotilus*,

понять, как эти микроорганизмы, для которых характерен прикрепленный образ жизни, приспособляются к переменным концентрациям молекулярного кислорода и сероводорода, которые характерны для таких биотопов. В таких условиях существуют динамические градиенты этих веществ, а также всегда присутствует тиосульфат, образующийся в результате химических реакций. Полученные данные позволят приблизиться к разгадке, каким образом бактерии эффективно используют тиосульфат в своей метаболической стратегии, приспособляются к изменяющимся условиям среды и объясняют их доминирующее положение в эконишах сероводородных источников.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

*Appl. Microbiol.*, 1969; 17(2): 320-321. <https://doi.org/10.1128/am.17.2.320-321.1969>

6. Lippert K.D., Pfennig N., Die Verwertung von molekularem wasserstoff durch chlorobium thiosulfatophilum. wachstum und CO<sub>2</sub>-fixierung [Utilisation of molecular hydrogen by *Chlorobium thiosulfatophilum*. Growth and CO<sub>2</sub>-fixation], *Arch. Mikrobiol.*, 1969; 65: 29-47. (In Russ.)

7. Winogradsky, S. Beiträge zur morphologie und physiologie der bacterien. In *Heft I. Zur Morphologie UND Physiologie Der Schwefelbacterien*; Arthur Felix: Leipzig, Germany, 1888: 1-120.

8. Larkin J.M., Strohl W.R., *Beggiatoa*, *Thiothrix*, and *Thioploca*, *Microbiol. Annual. Review of Microbiology.*, 1983; 37: 341-367. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.002013>

9. Rudenko T.S., Orlova M.V., Slepchenko A.V., Shatskiy N.D., Smoliakov D.D., Grabovich M.Y., Methylotrophy in *Azospirillum thioophilum* BV-S, *Sorbtsionnyye I Khromatograficheskiye Protssesy*, 2018; 18(3): 438-442. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2018.18/549> (In Russ.)



10. Hammer M., Mark J. Water and Waste-Water Technology. New York: John Wiley & Sons, Incorporated. 1974. 502 p.
11. Myers J.E., Farhat D., Guzman A., Arya V., Myers et al. Respond, *Am. J. Public Health*, 2019; 109(11): 21-22. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2019.305323>
12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 1951; 193(1): 265-75
13. 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., Thomson 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; 10: 8365. <https://doi.org/10.1038/srep08365>
14. Tamura K., Stecher G., Kumar S., MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11, *Mol. Biol. Evol.*, 2021; 38(7): 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
15. Haschke R.H., Campbell L.L., Thiosulfate reductase of *Desulfovibrio vulgaris*, *Bacteriol.*, 1971; 106(2): 603-607. <https://doi.org/10.1128/jb.106.2.603-607.1971>
16. Haja D.K., Wu C.H., Poole F.L. 2nd, Sugar J, Williams S.G., Jones A.K., Adams M.W.W., Characterization of thiosulfate reductase from *Pyrobaculum aerophilum* heterologously produced in *Pyrococcus furiosus*, *Extremophiles*, 2020; 24: 53-62. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01112-9>
17. Chauncey T.R., Uhteg L.C., Westley J., Thiosulfate reductase, *Methods Enzymol.*, 1987; 143: 350-354. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)43062-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)43062-0)
18. Bang S.W., Clark D.S., Keasling J.D., Engineering hydrogen sulfide production and cadmium removal by expression of the thiosulfate reductase gene (*phsABC*) from *Salmonella enterica* serovar typhimurium in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000; 66(9): 39-44. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3939-3944.2000>
19. Kramer M., Cypionka H., Sulfate formation via ATP sulfurylase in thiosulfate- and sulfite-disproportionating bacteria, *Arch. Microbiol.*, 1989; 151: 232-237. <https://doi.org/10.1007/BF00413135>
20. Saitou N., Nei M., The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.*, 1987; 4(4): 406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
21. Felsenstein J., Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution.*, 1985; 39: 783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
22. Zuckerkandl E., Pauling L., Molecules as documents of evolutionary history, *J. Theor. Biol.*, 1965; 8(2): 357-366. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(65\)90083-4](https://doi.org/10.1016/0022-5193(65)90083-4)

### Информация об авторах / Information about the authors

**Д.Д. Смольяков** – м.н.с кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**А.С. Алемова** – студент, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**Т.С. Руденко** – м.н.с кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**М.Ю. Грабович** – профессор кафедры биохимии и физиологии клетки, д.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**D.D. Smolyakov** – junior researcher, department of biochemistry and cell physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russia

**A.S. Alyomova** – student, department of biology, Voronezh State University, Voronezh, Russia

**T.S. Rudenko** – junior researcher, department of biochemistry and cell physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: [ipigun6292@gmail.com](mailto:ipigun6292@gmail.com)

**M.Yu. Grabovich** – prof., grand PhD (biology), department of biochemistry and cell physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: [margarita\\_grabov@mail.ru](mailto:margarita_grabov@mail.ru)

Статья поступила в редакцию 29.10.2023; одобрена после рецензирования 24.11.2023; принята к публикации 25.11.2023.

The article was submitted 29.10.2023; approved after reviewing 24.11.2023; accepted for publication 25.11.2023.