

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Трубицин Иван Васильевич

ДИССИМИЛЯЦИОННАЯ НИТРАТРЕДУКЦИЯ У
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕРОБАКТЕРИЙ РОДА *THIOTHRIX*: ОЧИСТКА И
ХАРАКТЕРИСТИКА РЕСПИРАТОРНОЙ НИТРАТРЕДУКТАЗЫ,
СКРИНИНГ ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПРОЦЕССАХ
ДЕНИТРИФИКАЦИИ

(специальность 03.01.04 - биохимия)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Грабович М.Ю.

Воронеж – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Денитрификация.....	14
1.1.1. Общая характеристика процесса.....	14
1.1.2. Молекулярно-биологические аспекты дыхания на нитратах.....	18
1.1.3. Нитратное дыхание.....	21
1.1.3.1. Нитратредуктазы прокариот.....	22
1.1.3.1.1. Определение, классификация.....	22
1.1.3.1.2. Каталитические свойства. Механизм восстановления нитрата до нитрита.....	23
1.1.3.1.3. Клеточная локализация.....	24
1.1.3.1.4. Ассимиляционные нитратредуктазы.....	24
1.1.3.1.5. Диссимиляционные нитратредуктазы.....	25
1.1.3.1.5.1. Мембраносвязанная респираторная нитратредуктаза.....	25
1.1.3.1.5.2. Периплазматическая нитратредуктаза.....	26
1.1.4. Транспорт нитратов.....	27
1.1.5. Дыхание на нитритах. Нитритредуктазы.....	28
1.1.6. NO- и N ₂ O-редуктазы.....	29
1.2. Диссимиляционная нитратредукция до аммония.....	31
1.3. АНАММОКС.....	34
1.4. Диссимиляционная нитратредуктаза NarGHI.....	35
1.4.1. Распространение.....	35
1.4.2. Функции.....	36
1.4.3. Особенности структурной организации.....	37

1.4.4. Физико-химические свойства.....	40
1.4.5. Устройство генного кластера <i>nar</i> , сборка фермента, регуляция экспрессии	44
1.5. Характеристика рода <i>Thiothrix</i>	46
1.5.1. Таксономический состав и филогенетическое положение	48
1.5.2. Экология	53
1.6. Заключение по обзору литературы.....	54
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	56
2.1. Материалы, приборы, реактивы, интернет-ресурсы	56
2.1.1. Используемые реактивы	56
2.1.2. Буферные растворы и реакционные смеси.....	56
2.1.3. Препараты ДНК	57
2.1.4. Белковые маркеры	57
2.1.5. Оборудование, программы, интернет-ресурсы	59
2.1.5.1. Оборудование.....	59
2.1.5.2. Программы и интернет-ресурсы	59
2.2. Микроорганизмы и их культивирование.....	59
2.2.1. Объекты исследования.....	59
2.2.2. Состав сред и условия культивирования.....	60
2.3. Молекулярно-биологические методы.....	61
2.3.1. Выделение геномной ДНК	61
2.3.2. ПЦР-амплификация ДНК	61
2.3.3. Очистка фрагментов ПЦР с помощью препаративного электрофореза.....	61
2.3.4. Выделение суммарной клеточной фракции РНК.....	63
2.3.5. Получение кДНК-копий (реакция обратной транскрипции) и ОТ-ПЦР	63

2.3.6. Определение нуклеотидной последовательности.....	64
2.3.7. Построение филогенетического дерева.....	64
2.4. Химические методы анализа.....	64
2.4.1. Анализ анионов.....	64
2.5. Методы определения активности ферментов.....	65
2.5.1. Определение активности нитратредуктазы.....	65
2.5.1.1. Получение бесклеточного экстракта.....	65
2.5.1.2. Определение активности нитратредуктазы.....	66
2.6. Очистка и характеристика респираторной нитратредуктазы.....	66
2.6.1. Очистка фермента.....	66
2.6.2. Определение молекулярной массы нативного препарата респираторной нитратредуктазы.....	67
2.6.3. Определение молекулярной массы субъединиц.....	68
2.6.4. Определение оптимума pH, температурного оптимума и термостабильности.....	69
2.6.5. Определение кинетических свойств нитратредуктазы NarGHI.....	70
2.7. Определение концентрации белка.....	70
2.8. Статистическая обработка результатов.....	70
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	71
3.1. Биохимия нитратного дыхания у представителей серобактерий рода <i>Thiothrix</i>	71
3.1.1. Анаэробный рост и динамика восстановления нитратов и образования нитритов при анаэробном дыхании на нитратах.....	71
3.1.2. Определение активности диссимиляционной нитратредуктазы.....	73
3.1.3. Очистка и характеристика респираторной нитратредуктазы.....	
<i>T. lacustris</i> AS.....	74
3.1.3.1. Очистка респираторной нитратредуктазы NarGHI.....	74

3.1.3.2. Молекулярные свойства мембраносвязанной нитратредуктазы.....	76
3.1.3.3. Физико-химические свойства респираторной нитратредуктазы	77
3.1.3.4. Кинетические и регуляторные свойства мембраносвязанной нитратредуктазы.....	79
3.1.3.5. Детекция гена <i>narG</i> , кодирующего респираторную нитратредуктазу.	81
3.1.3.6. Экспрессия гена <i>narG</i>	85
3.1.3.7. Филогенетический анализ последовательностей гена <i>narG</i>	87
3.2. Исследование метаболических путей восстановления нитрита при анаэробном дыхании у представителей рода <i>Thiothrix</i>	89
3.2.2. Скрининг функциональных генов, участвующих в диссимиляционных реакциях восстановления нитритов, окиси и закиси азота.....	90
3.2.2.1. Детекция нитритредуктазы	90
3.2.2.2. Детекция NO-редуктазы и N ₂ O-редуктазы	96
3.3. Связь экологических наблюдений с молекулярно-биологическими исследованиями	100
ГЛАВА 4. ОБУСЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	103
4.1. Схема очистки респираторной нитратредуктазы и особенности полученного препарата белка.....	103
4.1.2. Разработка схемы очистки фермента и обоснование использования конкретных методов.....	104
4.2. Особенности диссимиляционной нитратредукции у представителей рода <i>Thiothrix</i>	108
ВЫВОДЫ.....	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	115
ПРИЛОЖЕНИЯ	133

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- SDS – sodium dodecyl sulfate (англ.), додецилсульфат натрия
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- дАТФ – дезоксиаденозин-5'-трифосфат
- дГТФ – дезоксигуанозин-5'-трифосфат
- дНТФ – смесь четырех дезокси-нуклеозид-5'-трифосфатов
- ДТТ – дитиотрейтол
- дТТФ – дезокситимидин-5'-трифосфат
- дЦТФ – дезоксицитидин-5'-трифосфат
- ИПТГ - изопротил- β -D-тиогалактопиранозид
- ИР – ингибитор рибонуклеаз
- кДНК – комплементарная ДНК
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
- АМФ – аденозинмонофосфат
- ТВЕ – Трис-борат-ЭДТА буфер
- НАДФ(Н) – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленный)
- ФАД – флавинадениндинуклеотид
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- Е – ферментативная единица; количество фермента, превращающее 1 мкмоль субстрата за 1 мин.
- н/о – не определяли
- н/д – данные не представлены
- K_m – константа Михаэлиса
- V_{max} – максимальная скорость ферментативной реакции
- е.а. – единица активности
- IC_{50} – концентрация ингибитора, приводящая к 50% снижению активности фермента при данных условиях
- K_i – константа ингибирования

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Процесс анаэробного дыхания на нитратах был широко распространен среди микроорганизмов древней Земли еще до появления в атмосфере свободного кислорода. Впоследствии, аэробное дыхание стало доминирующим типом, однако немало микроорганизмов сохранили способность к дыханию на нитратах, которые выполняют роль терминального акцептора электронов в электронтранспортной цепи. На сегодняшний день помимо облигатных аэробов существует немало организмов – факультативных анаэробов, сохранивших способность к анаэробному дыханию в случае создания соответствующих условий в окружающей среде.

Бесцветные серобактерии занимают водные экологические ниши, где устанавливаются динамические градиенты молекулярного кислорода, или он отсутствует. Подавляющее большинство бесцветных серобактерий принадлежит к аэробам, но, оказавшись в микроаэробных или анаэробных условиях, эти организмы испытывают кислородный стресс, при котором индуцируются альтернативные дыхательные системы (Fossing *et al.*, 1995; Mc Natton *et al.*, 1996). Установлено, что факультативно аэробные серобактерии, такие как *Beggiatoa*, *Thioploca*, *Thiomargarita*, содержащие вакуоли, в которых накапливаются нитраты в высокой концентрации, выполняющие роль терминального акцептора электронов, часто являются инициаторами существенной доли общей морской нитратредукции (Fossing *et al.*, 1995; Mc Natton *et al.*, 1996). В связи с этим бактерии этих родов оказались важным связующим звеном между циклами серы, азота и углерода. Для представителей серобактерий рода *Thiothrix* способность к анаэробному дыханию в присутствии нитратов ранее не была показана. Однако возможность этого процесса не исключена, так как местообитание представителей рода *Thiothrix* характеризуется регулярным суточным ритмом смены аэробно-анаэробного режима в приливно-отливной зоне морской

литорали или в проточных водных экосистемах с высоким содержанием сульфида. Процесс смены аэробного типа дыхания на анаэробный в этом случае будет иметь глубокий экологический адаптационный смысл. В связи с этим особого внимания заслуживает процесс анаэробного дыхания - денитрификации, в котором активность ферментов, участвующих в восстановлении нитратов до газообразных продуктов, индуцируется в анаэробных условиях, т.е. в условиях стресса, которым часто подвергаются прокариоты в сероводородных биотопах. Несмотря на широкий спектр прокариот, способных к анаэробному дыханию в присутствии нитратов, данных по изучению свойств респираторных нитратредуктаз, катализирующих начальную реакцию денитрификации, недостаточно вследствие трудности работы с ними. Так, для представителей рода *Thiothrix*, которые, в соответствии с результатами недавних исследований, способны к анаэробному дыханию на нитратах, каких-либо данных об очистке респираторной нитратредуктазы нет ни в отечественной, ни в зарубежной литературе. В этой связи изучение респираторной нитратредуктазы *Thiothrix*, её очистка и характеристика выглядят интересными и актуальными задачами в области современной биохимии и микробиологии.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы было выявление и изучение процесса анаэробного дыхания у представителей серобактерий рода *Thiothrix*, выделение и характеристика ключевого фермента диссимиляционной нитратредукции – респираторной нитратредуктазы.

Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

1. Выявить способность к анаэробному нитратному дыханию ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$) среди представителей рода *Thiothrix* и изучить динамику процесса восстановления нитратов при анаэробном культивировании.

2. Установить структуру гена *narG*, кодирующего α -субъединицу респираторной нитратредуктазы, у представителей рода *Thiothrix* и оценить уровень его экспрессии в различных условиях культивирования.

3. Выделить в электрофоретически гомогенном состоянии респираторную нитратредуктазу из *T. lacustris* AS, изучить физико-химические свойства и кинетические характеристики этого фермента.

4. У представителей серобактерий рода *Thiothrix* (*T. lacustris* BL^T, AS; *T. caldifontis* G1^T, G3; *T. unzii* A1^T, TN; *T. eikelboomii* AP3^T; *T. nivea* JP2^T) провести скрининг на основе идентификации функциональных генов, участвующих в процессах денитрификации ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$): *nirS* и *nirK*, кодирующих нитритредуктазы, *qnorB* и *cnorB*, кодирующих NO – редуказы, и *nosZ*, кодирующего N₂O – редуказу.

5. Исследовать экспрессию гена *nirS* у *T. lacustris* AS в аэробных и анаэробных условиях культивирования и верифицировать способность к полной денитрификации у представителей рода *Thiothrix* на основе синтеза N₂ *de novo* в присутствии нитрата и закиси азота.

6. Выяснить эволюционные пути появления генов *narG*, *nirS* и *cnorB* у представителей рода *Thiothrix*.

Научная новизна

Для представителей серобактерий рода *Thiothrix*, считавшихся ранее облигатными аэробами, впервые показана возможность анаэробного дыхания в присутствии нитратов в качестве терминального акцептора электронов. Процесс смены аэробного типа дыхания на анаэробный имеет глубокий экологический адаптационный смысл.

Разработана схема очистки респираторной нитратредуктазы из серобактерии *Thiothrix lacustris* AS, позволяющая получить фермент в электрофоретически гомогенном состоянии. Изучены ее основные физико-химические и кинетические характеристики. Показано сходство фермента по температурному и pH оптимумам, термостабильности и кинетическим

характеристикам с респираторными нитратредуктазами близких таксономических групп бактерий.

Установлены структуры функциональных генов (*narG*, *nirS* и *cnorB*) ферментов денитрификации – нитрат-, нитрит- и NO-редуктаз. Показан высокий уровень их экспрессии в анаэробных условиях, что говорит об активной работе обнаруженных метаболических путей восстановления соединений азота. Идентифицированные в ходе выполнения данной работы гены были депонированы в GenBank.

Показано, что способность к денитрификации («полной» или «усеченной») может варьировать в пределах разных штаммов одного и того же вида и коррелирует с физико-химическими параметрами их среды обитания, такими как концентрация нитратов, а также сероводорода и кислорода.

Согласно филогенетическому анализу установлено, что у исследованных представителей рода *Thiothrix* отсутствуют случаи горизонтального переноса генов *narG* и *nirS*, тогда как ген *cnorB* был подвергнут горизонтальному переносу перед отделением современных видов *Thiothrix* от общего предка рода.

Научно-практическая значимость

Разработана схема очистки респираторной нитратредуктазы из бактерий рода *Thiothrix*, позволяющая получить фермент в электрофоретически гомогенном состоянии. Данная схема отработана, оптимизирована с учетом особенностей изучаемого фермента и может быть использована без существенных изменений для очистки респираторной нитратредуктазы из других представителей рода *Thiothrix*.

Подобраны родоспецифичные праймеры для гена *narG*, что может позволить для каждого нового штамма и вида рода *Thiothrix* быстро и достоверно определить наличие или отсутствие в геноме гена α -субъединицы респираторной нитратредуктазы NarGHI. Также разработаны родоспецифичные праймеры для генов *nirS* и *cnorB*.

Полученные в ходе выполнения данной работы материалы были использованы при написании методического пособия по метаболизму соединений азота у прокариот. Учитывая новые возможности представителей рода *Thiothrix* – способность к анаэробному дыханию на нитратах, их можно использовать для очистки водных экосистем не только от органических веществ и токсичных соединений серы, но и от нитратов.

Полученные в работе результаты могут быть использованы для чтения курсов лекций по микробиологии в высших учебных заведениях, в справочных изданиях по микробиологии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Некоторые представители серобактерий рода *Thiothrix*, которых ранее относили к облигатным аэробам, способны к анаэробному дыханию в присутствии нитратов: нитратному дыханию и денитрификации. Способность к денитрификации («полной» или «усеченной») может варьировать в пределах разных штаммов одного вида и коррелирует с физико-химическими параметрами их среды обитания.

2. Нитратное анаэробное дыхание свойственно большинству представителей рода *Thiothrix* и осуществляется при участии респираторной нитратредуктазы, которая кодируется геном *narG*; последний экспрессируется в анаэробных условиях.

3. Выделенный гомогенный препарат респираторной нитратредуктазы NarGH из *T. lacustris* AS представляет собой гетеродимер с молекулярной массой отдельных субъединиц NarG – около 100 кДа и NarH – около 80 кДа.

4. У исследованных представителей рода *Thiothrix*, способных к денитрификации, из трех альтернативных нитритредуктаз (NirS, NirK и NrfA) функционирует редуктаза, которая кодируется геном *nirS*; восстановление окиси до закиси азота осуществляет цитохром *c* зависимая NO-редуктаза, которая из двух альтернативных генов (*qnorB* и *cnorB*) кодируется геном *cnorB*.

5. Согласно филогенетическому анализу, у исследованных представителей рода *Thiothrix* отсутствуют недавние случаи горизонтального переноса генов *narG* и *nirS*, тогда как ген *snorB* был подвергнут горизонтальному переносу перед отделением современных видов *Thiothrix* от общего предка рода.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на 4-х международных и российских мероприятиях: 15-ая и 16-ая Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука 21-го века» (Пушино, 2011; 2012), IV Всероссийский с международным участием конгресс студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз Россия 2011» (Воронеж, 2011), 5th FEMS Congress of European Microbiologists (Leipzig, Germany, 2013).

Личный вклад автора. Автор лично участвовал в проведении всех экспериментальных исследований, обработке полученных и изложенных в диссертации результатов, их анализе и обсуждении, а также совместно с соавторами участвовал в написании научных статей и апробации результатов исследования на семинарах, конференциях и симпозиумах.

Достоверность научных результатов. Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных и обусловлена широкой апробацией и надежностью использованных экспериментальных методов исследования, а также качественной и количественной согласованностью с результатами независимых исследований других авторов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них 4 статьи в рецензируемых изданиях, входящих в список ВАК.

Конкурсная поддержка работы. Проведенные исследования поддерживались грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 12-04-00920а «Новые направления в исследовании метаболизма и таксономии бесцветных серобактерий: диссимиляционная нитратредукция в

семействе *Thiotrichaceae* и новые таксоны в семействе *Spirochaetaceae*» и в рамках проекта Госзаказа Минобрнауки РФ № 959 «Исследование роли ферментов и альтернативных метаболических путей в адаптивных реакциях клеток эукариотных и прокариотных организмов».

Структура и объём работы. Диссертация состоит из 8 разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, выводы, список литературы, приложения. Работа изложена на 135 страницах, содержит 14 таблиц и 47 рисунков. Библиографический указатель содержит 155 источников литературы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Денитрификация

1.1.1. Общая характеристика процесса

Нитрат является одним из ключевых химических соединений в окружающей среде. Он занимает одну из ключевых позиций в системе конструктивного метаболизма (ассимиляционная нитратредукция), а также в энергетическом - может выступать терминальным акцептором электронов в электронтранспортной цепи (ЭТЦ) многих бактерий и архей при анаэробном дыхании (диссимиляционная нитратредукция). Последнее является объектом нашего внимания.

Высказываются предположения, что процесс дыхания на нитратах был широко распространён среди микроорганизмов древней Земли ещё до появления в атмосфере свободного кислорода. Впоследствии, аэробное дыхание стало доминирующим типом, однако немало микроорганизмов сохранили способность к дыханию на нитратах.

Известно, что с энергетической точки зрения наиболее эффективным является дыхание с использованием в качестве терминального акцептора электронов кислорода. Однако, в случае, если концентрация кислорода в среде слишком мала или он отсутствует, у бактерий могут индуцироваться альтернативные дыхательные системы.

Показано, что изменение свободной энергии при окислении 1 молекулы глюкозы молекулярным кислородом ($\Delta G_0 = -2870$ кДж/моль) того же порядка, что и окисление этого же субстрата в анаэробных условиях нитратом, восстанавливающимся до нитрита ($\Delta G_0 = -1770$ кДж/моль) или молекулярного азота ($\Delta G_0 = -2700$ кДж/моль). Таким образом, энергетические возможности процесса окисления глюкозы с участием нитрата сопоставимы с энергетическими возможностями процесса аэробного дыхания.

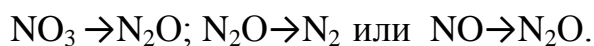
Существует огромное многообразие микроорганизмов, способных расти в анаэробных условиях постоянно, или же периодически перестраиваться с

одного типа дыхания на другой под влиянием динамически изменяющихся условий внешней среды. Химические соединения, используемые прокариотами в качестве терминальных акцепторов электронов для анаэробного дыхания также весьма многообразны. Это могут быть металлы (Fe^{3+} , Mn^{4+}), неметаллы (S^0), оксиды (NO_3^- , NO_2^- , NO , N_2O , SO_4^{2-} , SeO_4^{2-} , AsO_4^{3-}), органические соединения (фумарат). Процесс, в результате которого нитраты и нитриты через цепь промежуточных газообразных соединений восстанавливаются до молекулярного азота, называется денитрификацией.

Восстановление нитрата до нитрита в системе энергетического метаболизма получило название нитратного дыхания. Данный процесс широко распространен среди бактерий и обнаружен у представителей более 70 родов (Гусев, Минеева, 2003). Гораздо уже круг организмов, способных восстанавливать нитраты или нитриты до N_2 . На этом пути в качестве промежуточных продуктов идентифицированы окись (NO) и закись (N_2O) азота: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$.

Как и молекулярный азот, NO и N_2O – газообразные продукты. Полную денитрификацию до молекулярного азота проводят только представители прокариот. Недавно было показано, что некоторые мицелиальные грибы способны восстанавливать нитриты до NO или N_2O , но только если в среде присутствует кислород в небольшой концентрации (Morozkina and Kurakov, 2007).

Значение процесса денитрификации – генерирование АТФ в анаэробных условиях, где процесс восстановления оксидов азота, выполняющих роль терминальных акцепторов электронов при анаэробном дыхании, сопряжен с функционированием ЭТЦ. Наиболее распространенные формы денитрификации – восстановление NO_3^- или NO_2^- до N_2 . Встречаются также штаммы, осуществляющие отдельные этапы процесса:



«Полная» или «усеченная» денитрификация обнаружена у прокариот, принадлежащих ко всем основным физиологическим группам: фототрофам и

хемолитотрофам, грамположительным и грамотрицательным факультативным анаэробам. Сам процесс денитрификации представляет собой одну из основных реакций в системе круговорота азота в природе наряду с аммонификацией, фиксацией азота и нитрификацией (рис. 1).

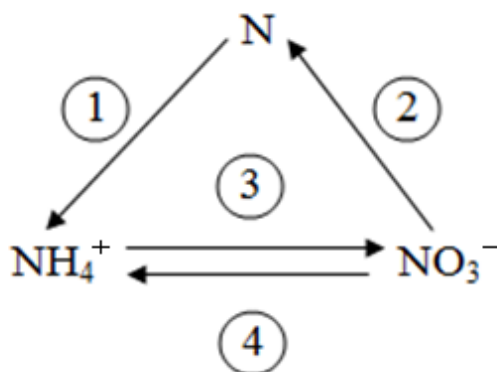


Рис. 1. Процессы, составляющие круговорот азота в природе: 1 – фиксация азота, 2 – денитрификация, 3 – нитрификация, 4 – аммонификация.

Данная схема показывает лишь основные составляющие круговорота азота в биосфере. В действительности, это разветвлённая сеть параллельных и последовательных реакций. В частности, восстановление нитрата до молекулярного азота может протекать различными способами с участием разных групп ферментов (рис. 2).

Запасание клеткой полезной энергии при денитрификации зависит от организации электронного транспорта, свойств и локализации редуктаз ЭТЦ денитрификаторов в анаэробных условиях содержат все основные типы связанных с мембранами переносчиков: флавопротеины, хиноны (убихинон, менахинон или нафтохинон), цитохромы типа *b*, *c*. Цитохромоксидазы в этих условиях не синтезируются. Полный процесс денитрификации состоит из 4 восстановительных этапов, каждый из которых катализируется специфической редуктазой (рис. 3).

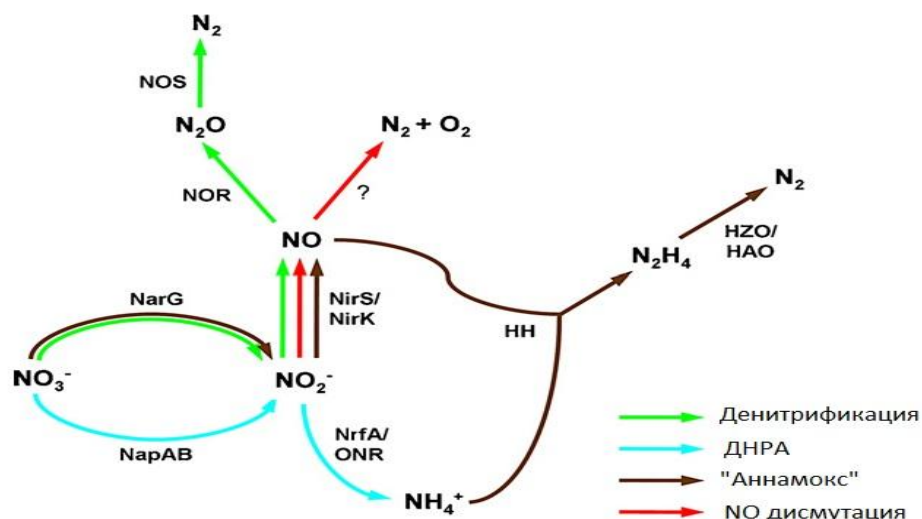


Рис. 2. Возможные пути восстановления нитрата до газообразного азота: процессы, ферменты, промежуточные соединения (Kumar and Lin, 2010).

? – неохарактеризованный на сегодняшний день фермент, Nar – мембраносвязанная нитратредуктаза, Nar – периплазматическая нитратредуктаза, HAO – гидразиноксидаз, HZO – гидразиноксилюющий фермент, HH – гидразингидролаза, Nir – нитритредуктаза, NOR – NO редуктаза, NOS – N₂O редуктаза, Nrf – нитритредуктаза, ONR – цитохромсредуктаза. ДНРА – диссимиляционная нитратредукция до аммония.

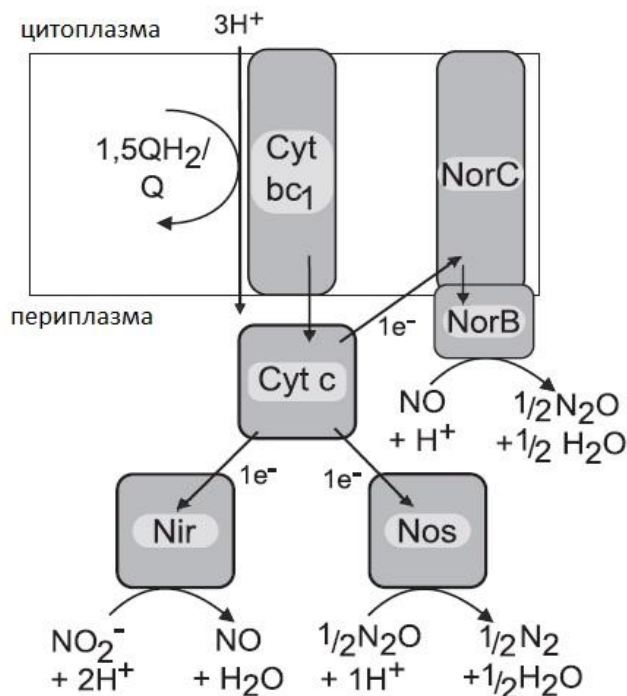


Рис. 3. Ферменты, участвующие в процессе денитрификации (Cabello *et al.*, 2004).

Cyt *bc*₁ – цитохром *bc*₁, Cyt *c* – цитохром *c*, Nir – нитритредуктаза, Nor – NO-редуктаза, Nos – N₂O-редуктаза. Респираторная нитратредуктаза на схеме не представлена по причине её обособленного положения.

Нитратредуктазы всех денитрификаторов структурно сходны между собой и катализируют восстановление нитрата до нитрита в соответствии с уравнением: $\text{NO}_3^- + 2\bar{e} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$.

С дыхательной цепью нитратредуктазы сопряжены на уровне цитохрома *b*. Нитритредуктазы (*Nir*) и, вероятно, редуктазы окиси (*Nor*) и закиси (*Nos*) азота акцептируют электроны на уровне цитохрома *c*. В дыхательной цепи денитрификаторов при переносе электронов на нитрат функционируют 2 генератора трансмембранного потенциала (вместо 3 при переносе электронов на O_2).

Процесс восстановления нитрата до нитрита локализован на внутренней стороне цитоплазматической мембраны. Однако, в ряде случаев, ферментный комплекс может иметь трансмембранную ориентацию, в результате чего поглощенные из цитоплазмы протоны переносятся на противоположную сторону, где участвуют в нитратредуктазной реакции. В любом из вариантов это приводит к созданию трансмембранного протонного градиента нужного направления. Таким образом, при денитрификации перенос 2 электронов сопряжен с трансмембранным переносом 4 протонов, т. е. энергетический выход составляет примерно 70 % сравнительно с аэробным дыханием.

1.1.2. Молекулярно-биологические аспекты дыхания на нитратах

Важным результатом в начале генетического анализа нитратного дыхания ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$) у прокариот стало обнаружение респираторной (*nar*) и ассимиляционной (*nas*) нитратредуктазных систем, кодируемых разными наборами генов (Sias *et al.*, 1980). Наличие этих систем было показано для *Ralstonia eutropha* (Warnecke-Eberz and Friedrich, 1993) и *Klebsiella pneumoniae* (Lin *et al.*, 1994; Wientjes *et al.*, 1979) и, как было показано позже, является закономерным для всех денитрификаторов, способных к ассимиляции нитрата. Различия в генетических основах для дыхательных и ассимиляционных процессов проявляются в регуляции экспрессии соответствующих генов. Гены ассимиляции нитратов подавляются высокой

концентрацией аммиака и не реагируют с кислородом, в то время как экспрессия *nar* генов происходит при низкой концентрации кислорода и не зависит от аммония. Кислород ингибирует поглощение нитратов для осуществления дальнейшего процесса дыхания, но никак не влияет на ассимиляцию (Hernandez and Rowe, 1988).

В настоящее время гены ферментов – редуктаз, осуществляющих восстановление нитрата до молекулярного азота, идентифицированы у бактерий различных экологических и систематических групп (табл.1).

Также обнаружено большое количество других генов, в той или иной мере связанных с данным процессом восстановления нитратов: регуляторные гены, гены, кодирующие транспортные белки или ответственные за биосинтез соответствующих коферментов. Работа в этом направлении продолжается, однако уже сейчас можно утверждать, что для осуществления процесса респираторной денитрификации одному организму требуется около 50 различных генов (Zumft, 1997).

Гены, ответственные за процессы нитратного (*nar*) и нитритного (*nir*) дыхания, а также, дыхания на NO (*nor*) и N₂O (*nos*), расположены в кластерах. У разных организмов отдельные кластеры генов могут быть локализованы слитно (рис. 4). Такая локализация в живой клетке приводит к тому, что гены нескольких ферментов одного метаболического пути экспрессируются сразу. Это выглядит вполне естественно, поскольку в процессе денитрификации в цепи последовательных реакций продукт предыдущей реакции является субстратом для последующей.

Для осуществления полного восстановления нитрата до газообразного азота клетке зачастую требуется весь комплекс ферментов сразу. Однако существует немало бактерий, способных осуществлять только отдельные этапы респираторной денитрификации.

Таблица 1. Распространенность различных типов нитратредуктаз у прокариот (Richardson *et al.*, 2001)

Представители	Nar	Nap	Nas	Представители	Nar	Nap	Nas
<i>Alphaproteobacteria</i>				<i>Gammaproteobacteria</i>			
<i>Caulobacter crescentus</i>			+	<i>Escherichia coli</i>	+		+
<i>Paracoccus pantotrophus</i>	+	+	+	<i>Haemophilus actinomycetemcomitons</i>		+	
<i>Rhodobacter capusulatus AD2</i>		+	+	<i>Haemophilus ducreyi</i>		+	
<i>Rhodobacter capusulatus BK5</i>	+		+	<i>Haemophilus influenzae</i>		+	
<i>Rhodobacter capusulatus EIF1</i>			+	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	+
<i>Rhodobacter sphaeroides f.sp. denitrificans</i>	+	+	+	<i>Legionella pneumophila</i>		+	
<i>Sinorhizobium eliloti</i>		+		<i>Pasteurella multocida</i>		+	
<i>Betaproteobacteria</i>				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		+		<i>Pseudomonas putida</i>			+
<i>Ralstonia eutropha</i>	+	+	+	<i>Salmonella paratyphimurium</i>	+	+	
<i>Deltaproteobacteria</i>				<i>Salmonella typhimurium</i>	+	+	
<i>Desulfoibrio desulfuricans</i>		+		<i>Shewanella putrefaciens</i>		+	+
<i>Cyanobacteria</i>				<i>Epsilonproteobacteria</i>			
<i>Synechococcus sp. PCC7942</i>			+	<i>Campylobacter jejuni</i>		+	
<i>Synechocystis sp. PCC6803</i>			+	Gram-Positive Bacteria			
<i>Anabaena</i>			+	<i>Bacillus subtilis</i>	+		+
<i>Oscillatoria</i>			+	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	+		+
<i>Deinococcus Group</i>				<i>Corynebacterium diptheriae</i>	+		
<i>Thermus thermophilus</i>	+			<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+		
<i>Aquificales</i>				<i>Mycobacterium bovis</i>	+		
<i>Aquifex aeolicus</i>			+	<i>Mycobacterium avium</i>	+		+
<i>Crenarchaeota</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>	+		
<i>Aeropyrum pernix</i>	+			<i>Staphylococcus carnosus</i>	+		
<i>Euryarchaeota</i>				<i>Streptomyces coelicolor</i>	+		+
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	+						

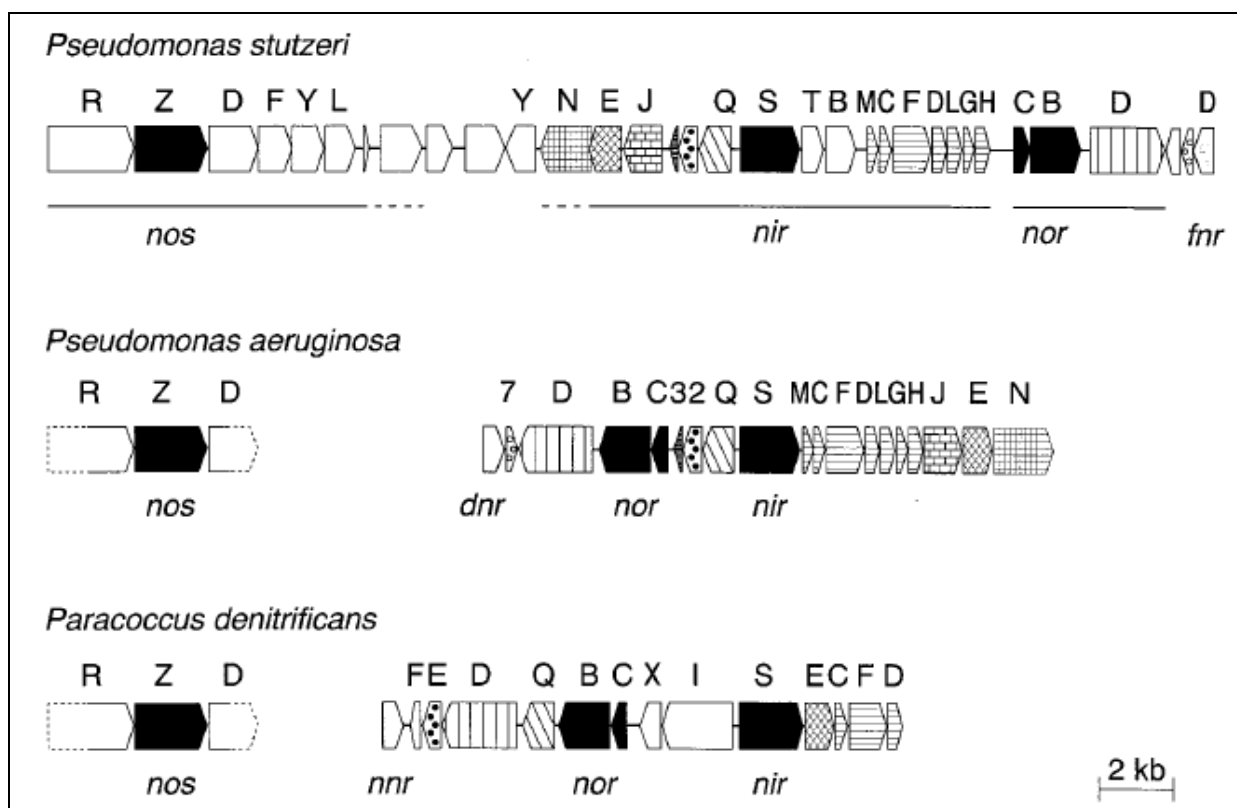


Рис. 4. Схема локализации некоторых генов азотного метаболизма.

Гены, кодирующие редуктазы, выделены чёрным. Масштаб – 1 см : 2000 п.о. (Zumft, 1997).

У таких микроорганизмов могут отсутствовать некоторые гены азотного метаболизма (а иногда и целые кластеры), а имеющиеся гены локализованы так, чтобы в соответствующих условиях внешней среды индуцировались только «нужные» ферменты.

1.1.3. Нитратное дыхание

В целом весь процесс диссимиляционной нитратредукции сводится к восстановлению нитрата, а именно атома азота в составе данного иона, до молекулярного азота N_2 через цепь промежуточных соединений. Нитратное дыхание ($NO_3^- \rightarrow NO_2^-$) является начальной ступенью данного пути, поскольку продукт данной реакции является субстратом для дальнейших реакций восстановления. Однако известны бактерии, у которых отсутствует данный этап, что доказано как на молекулярном, так и на биохимическом уровне (Richardson *et al.*, 2001, Coppola D., 2013), но, в то же время, присутствуют

ферменты, позволяющие осуществлять другие этапы денитрификации поотдельности.

Показано, что если денитрифицирующая бактерия способна ассимилировать нитраты, то реакция может проходить одновременно с нитратным дыханием. С другой стороны, способность к ассимиляционной нитратредукции необязательно облигатно связана со способностью к денитрификации. Возникал вопрос, может ли обе реакции осуществлять один фермент. Однако скоро было установлено, что за данные процессы ответственны разные гены, расположенные в разных локусах хромосомы (Vairinhos *et al.*, 1989). Респираторную нитратредуктазу кодируют гены *nar*, за ассимиляционный фермент ответственны гены *nas*. Таким образом, сходные химические реакции с молекулярно-генетической позиции имеют совершенно разную природу. Тем не менее, всё же существует несколько генов, общих для двух метаболических путей. Предположительно они ответственны за синтез молибденового кофактора и транспорт нитратов (Goldflam and Rowe, 1983).

Помимо респираторной нитратредуктазы *Nar* и ассимиляционной *Nas* существует ещё один диссимиляционный фермент. Это нитратредуктаза семейства *Nar*. Данные ферменты, осуществляя, по сути, одну и ту же реакцию в составе различных метаболических путей, существенно различаются как по структуре и внутриклеточной локализации, так и по физико-химическим и кинетическим характеристикам (Warnecke-Eberz and Friedrich, 1993).

1.1.3.1. Нитратредуктазы прокариот

1.1.3.1.1. Определение, классификация

Нитратредуктазы прокариот относятся к сложным белкам, имеющим в своей структуре в качестве простетической группы атомы молибдена. Молибденсодержащие ферменты присутствуют почти во всех формах жизни и

играют существенную роль в метаболизме углерода, серы и азота (Stolz and Basu, 2002).

Выделяют три семейства молибденсодержащих ферментов: ксантиноксидазы, сульфитоксидазы и диметилсульфоксидредуктазы, к которым и относятся все молибденсодержащие нитратредуктазы прокариот. В каждом семействе ион молибдена встроен в активный центр фермента (рис. 5, 6). Вспомогательные группы, такие, как оксо-, гидроксо- и побочные белковые цепи дополняют координационную сферу.

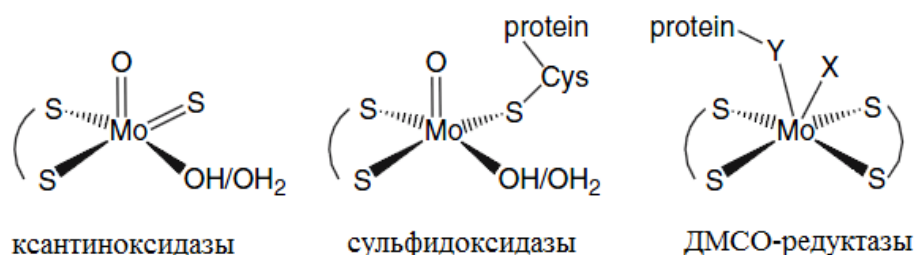


Рис. 5. Устройство активного центра в трёх семействах молибденсодержащих ферментов (Hofmann, 2007).

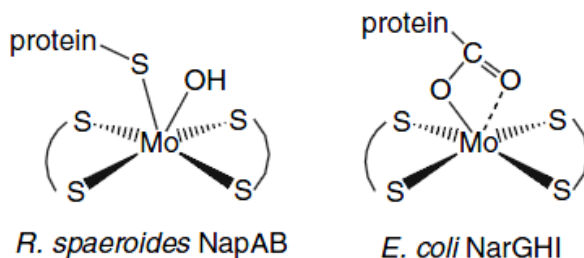


Рис. 6. Устройство активного центра молибдензависимых нитратредуктаз (Hofmann, 2007).

1.1.3.1.2. Каталитические свойства. Механизм восстановления нитрата до нитрита

Восстановление нитрата в нитрит происходит с изменением степени окисления атома молибдена с +4 до +6. Затем металл восстанавливается, потребляя из реакционной смеси два электрона, при этом из двух протонов образуется молекула воды.

Данная реакция в живых организмах выполняет три основные функции: включение азота в биомолекулы (ассимиляционная аммонификация),

получение энергии для внутриклеточных процессов и дыхание (Stolz and Basu, 2002). Восстановление нитрата молибдоферментом является важным шагом в круговороте азота (Kroneck and Abt, 2002; Cabello *et al.*, 2004).

1.1.3.1.3. Клеточная локализация

Ферменты, восстанавливающие нитрат, могут иметь различную клеточную локализацию в зависимости от выполняемых функций. Ассимиляционная нитратредуктаза (Nas) расположена в цитоплазме. Продукт реакции, катализируемой данным ферментом, идет непосредственно на построение клеточных белков. Респираторная нитратредуктаза (Nar) закреплена на цитоплазматической мембране и обращена активным центром в цитоплазму. Такая локализация способствует созданию трансмембранного потенциала за счет снижения концентрации протонов на внутренней стороне мембраны. Диссимиляционная нитратредуктаза Nar расположена в периплазматическом пространстве. Данный фермент активно участвует в процессе диссимиляционной нитратредукции при переходе из аэробных условий в анаэробные.

1.1.3.1.4. Ассимиляционные нитратредуктазы

Ассимиляционные нитратредуктазы прокариот могут быть разделены на три подгруппы в зависимости от характера и качества кофакторов электронного переноса. Типичными примерами данных ферментов являются нитратредуктазы *Synechococcus sp.* PCC7942, *Klebsiella oxytoca* и *Bacillus subtilis* (Lin and Stewart, 1998).

Анализ генного кластера (*nas*FEDCBA) ассимиляционной нитратредуктазы *K. oxytoca* показал, что фермент состоит из двух субъединиц. Каталитическая субъединица NasA несёт молибденовый кофактор, один [4Fe-4S] кластер и один [2Fe-2S] кластер (Lin *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1994). Вторая субъединица NasC связывает кофактор ФАД и

осуществляет перенос электронов от НАД(Ф)Н на каталитическую субъединицу.

Анализ нуклеотидной последовательности ассимиляционной нитратредуктазы *Synechococcus sp.* PCC7942 показал, что данный фермент устроен проще, чем у *K. oxytoca*. Он представляет собой одну субъединицу массой 70 кДа, несущую в активном центре молибденовый кофактор и один [2Fe-2S] кластер (Rubio *et al.*, 1996). Донором электронов выступает ферредоксин восстановленный, образованный в фотосистеме I.

1.1.3.1.5. Диссимиляционные нитратредуктазы

1.1.3.1.5.1. Мембраносвязанная респираторная нитратредуктаза

Мембраносвязанная респираторная нитратредуктаза экспрессируется только в анаэробных условиях и является комплексом из 2 или 3 субъединиц: NarG, NarH, NarI (рис.7).

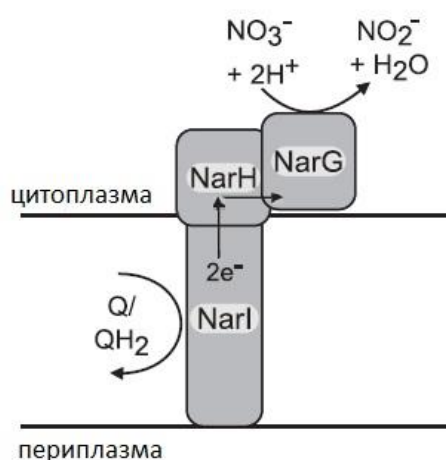


Рис. 7. Мембраносвязанная респираторная нитратредуктаза NarGHI (Martinez-Espinosa *et al.*, 2007).

Субъединица NarI закрепляет весь комплекс на внутренней стороне мембраны. Также некоторые специалисты приписывают ей функцию транспорта электронов (Berks *et al.*, 1995). NarG – большая, или α-субъединица. Она несёт молибден в виде кофактора, который интегрирован в активный центр фермента. NarH – малая, или β-субъединица. Она связывает три [4Fe-4S] кластера и один [3Fe-4S] кластер (Guigliarelli *et al.*, 1992). Эти

кластеры обладают различными окислительно-восстановительными потенциалами. Таким образом, респираторная нитратредуктаза обычно представляет собой гетеротример, состоящий из субъединиц следующей массы: NarG – от 93 до 145 кДа, NarH – от 55 до 64 кДа и NarI – от 13 до 26 кДа. Однако очищенные препараты нитратредуктазы нередко представляют собой гетеродимер NarGH. Это связано с потерей субъединицы NarI в процессе очистки фермента.

1.1.3.1.5.2. Периплазматическая нитратредуктаза

В то время как гены мембраносвязанной нитратредуктазы экспрессируются только в анаэробных условиях, периплазматическая нитратредуктаза (Nar) синтезируется клеткой и проявляет активность в присутствии кислорода (Bell *et al.*, 1990).

Стоит отметить, что индукция синтеза мембраносвязанной и периплазматической нитратредуктаз происходит только в присутствии нитратов с участием белков-сенсоров – NarQ и NarX.

Периплазматическая нитратредуктаза является гетеродимером, состоящим из следующих субъединиц: NarA (90 кДа) и NarB (18 – 20 кДа) (рис. 8).

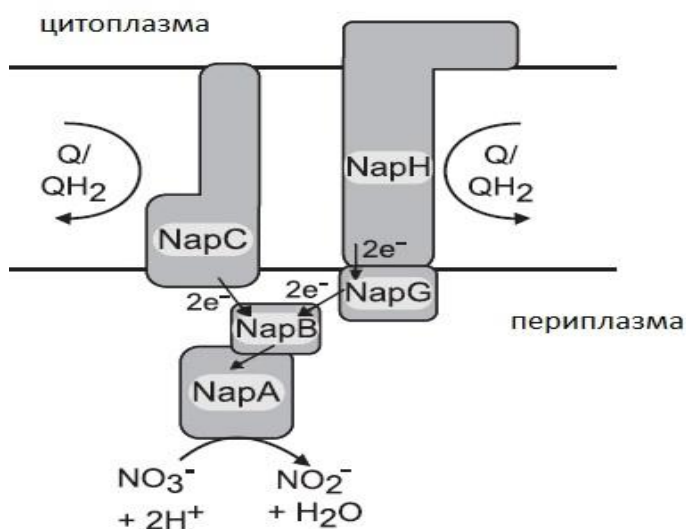


Рис. 8. Периплазматическая нитратредуктаза NarAB и смежные ферменты в системе восстановления нитрата (Cabello *et al.*, 2004).

Обе субъединицы синтезируются с сигнальными пептидами, что обусловлено их локализацией в периплазматическом пространстве.

Субъединица NarA связывает молибденовый кофактор и [4Fe-4S]-кластер (Breton *et al.*, 1994), несёт на себе активный центр фермента. По аминокислотной последовательности субъединица NarA имеет сходство с ассимиляционной нитратредуктазой *E. coli*.

Малая субъединица NarB не показывает сходства с другими ферментами. Функция NarB, предположительно, состоит в координации гема.

Физиологическая роль периплазматической нитратредуктазы, как полагают, состоит в рассеивании избытка энергии и обеспечения транспорта нитритов для анаэробной денитрификации. Фермент может функционировать также при переходе от аэробноза к анаэробнозу, так как кислород, вероятно, может ингибировать транспорт нитратов (Hernandez and Rowe, 1988).

1.1.4. Транспорт нитратов

Каталитический центр нитратредуктазы NarGHJ ориентирован в цитоплазму и генерирует нитрит с внутренней стороны мембраны. В противоположность этому, нитритредуктазы являются периплазматическими ферментами. Таким образом, клетке необходимы транспортные системы, поддерживающие постоянную концентрацию нитрата в цитоплазме и нитрита в периплазматическом пространстве. Такая система существует, однако на данный момент мало изучена. Предполагают, что она представляет собой антипортер, как наиболее энергетически выгодный механизм транспорта заряженных молекул (Danneberg *et al.*, 1989). Вместе с тем существует и другая система – нитрат-протонный симпорт. Она также переносит нитраты через мембрану в цитоплазму, но работает с затратой энергии (Boogerd *et al.*, 1983). Однако такая система крайне важна для любого денитрификатора, так как для старта всего процесса нитратредукции и, в частности, инициализации нитрат-нитритного антипортера, необходимо некоторое количество нитрата в цитоплазме.

1.1.5. Дыхание на нитритах. Нитритредуктазы

Процесс восстановления нитрита до монооксида азота могут осуществлять два совершенно разных фермента. У бактерий, принадлежащих к разным систематическим группам, имеющих разную физиологию и занимающим разные экологические ниши, могут функционировать медьсодержащие или цитохромсодержащие нитритредуктазы (Gamble *et al.*, 1977).

Медьсодержащий фермент (CuNIR), широко распространенный среди прокариот, обычно является гомотримером. Каждый мономер несёт 2 медных центра: тип 1 и тип 2 (рис.9).

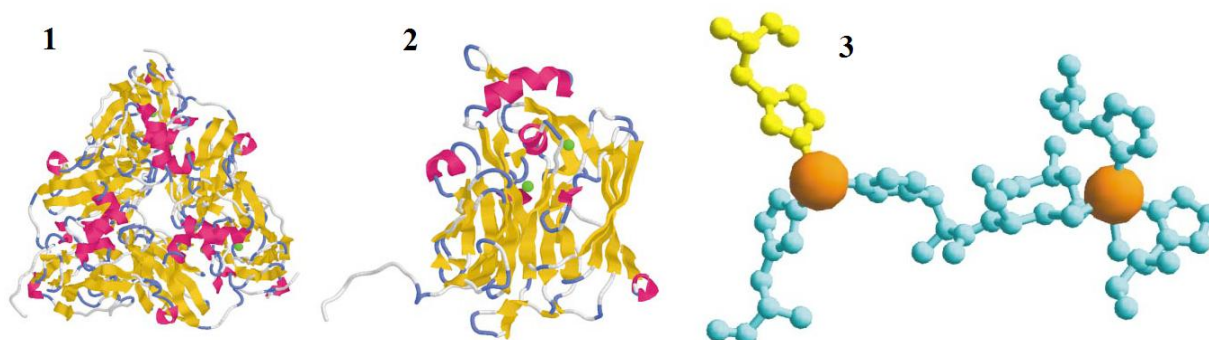


Рис. 9. Структура медьсодержащей нитритредуктазы NirK из *Achromobacter cycloclastes*.

1 – тример, 2 – мономер, 3 – схема устройства медных центров (Moura and Moura, 2001).

Каталитический центр формируют три атома меди 2 типа, в то время, как атомы меди 1 типа формируют координационную сферу и участвуют в транспорте электронов (LaCroix *et al.*, 1996).

Нитрит связывается с ферментом в медном центре 2 типа, заменяя собой экзогенные лиганды (медь или хлорид). Далее происходит перенос электронов с меди 1 типа, в результате чего нитрат восстанавливается до нитрита (Moura and Moura, 2001; Zumft, 1997).

Нитритредуктазы NirK (CuNIR) можно разделить на 2 группы: зелёные (группа I) и синие (группа II). Такое разделение основано на адсорбционных свойствах ферментов. Большинство охарактеризованных на сегодняшний день CuNIR принадлежат к I группе. Однако недавно были обнаружены ферменты, несущие дополнительный домен на N-конце. Данные нитритредуктазы объединены в группу II (Nojiri *et al.*, 2007).

Цитохромсодержащие нитритредуктазы представлены нитритредуктазой NirS. Данный фермент является гомодимером и локализован в периплазматическом пространстве. Каждый из 2 мономеров связывает 2 простетические группы гемма: гем *c* и гем *d*₁ (рис. 10).

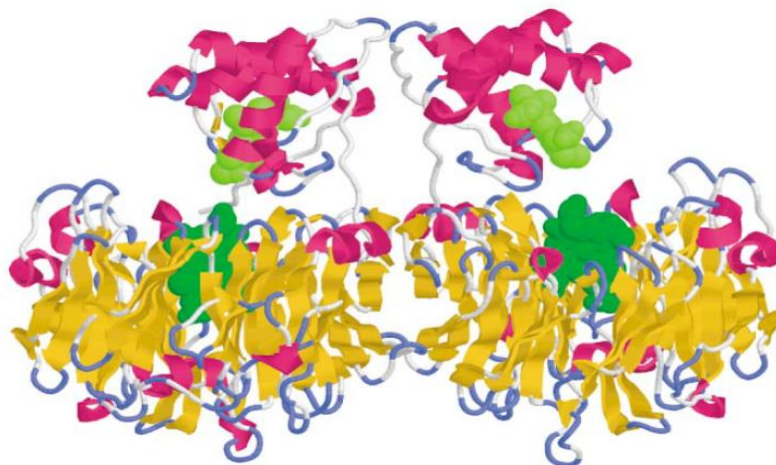


Рис. 10. Структура цитохромсодержащей нитритредуктазы NirS в димерной форме из *P. denitrificans* GB17 (Moura and Moura, 2001).

Зелёным цветом выделены гем *c* (вверху) и гем *d*₁(внизу).

Электроны переносятся от донора – цитохром_{с551} на гем *c* и, далее, на гем *d*₁. Здесь нитриты связываются ферментом и восстанавливаются до оксида азота посредством сброса электронов на атом азота (Baker *et al.*, 1997; Fülöp *et al.*, 1995).

1.1.6. NO- и N₂O-редуктазы

Продукт реакции восстановления нитритов нитритредуктазами является субстратом для следующей реакции в системе денитрификации. Данную реакцию катализируют мембраносвязанные NO-редуктазы. Монооксид азота

является молекулой с высокой химической активностью и может неспецифически реагировать с другими химическими соединениями. Поэтому чрезмерное накопление данного вещества в живой клетке недопустимо. Ряд исследований указывает на совместное функционирование NO_2^- - и NO -редуктаз (Spiro, 2007; Tosques *et al.*, 1997; Zumft, 2005). В этом случае монооксид азота вовлекается в реакцию дальнейшего восстановления и не накапливается в клетке.

NO -редуктазы являются железосодержащими ферментами, локализованными на наружной стороне цитоплазматической мембраны. В отличие от NO -редуктаз мицелиальных грибов, которые являются водорастворимыми ферментами и содержат один гем в своём активном центре, бактериальные редуктазы плотно закреплены на мембране (рис. 11) и имеют структуру, полностью отличную от своих грибных аналогов.

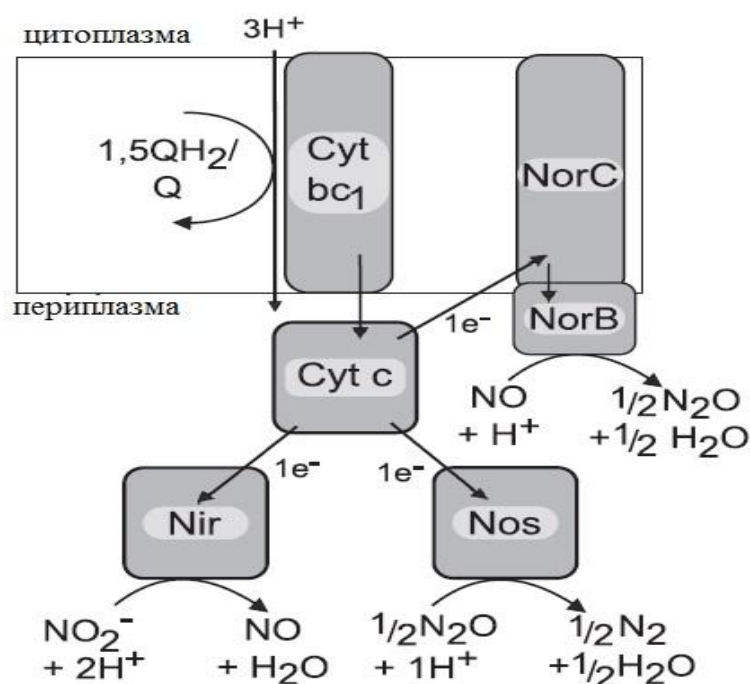


Рис. 11. Нитритредуктазы, NO - и N_2O -редуктазы в системе диссимиляционной нитритредукции, внутриклеточная локализация и осуществляемые реакции (Martinez-Espinosa *et al.*, 2006).

Nir – нитритредуктаза, NorBC – NO -редуктаза, Nos – N_2O -редуктаза.

Так, в активном центре бактериальных NO редуктаз помимо гема находится одно негемовое железо, которое, по сути, и является активным центром фермента. При сравнении нуклеотидных последовательностей белков также налицо существенные различия.

Бактериальные NO-редуктазы были впервые обнаружены в 1971 году, после чего было охарактеризовано множество этих ферментов, полученных из микроорганизмов различных экологических и систематических групп. На сегодняшний день известно 3 типа бактериальных NO-редуктаз: cNOR, qNOR и qCuANOR, наиболее изученным из которых является тип цитохром-*c* зависимых ферментов cNOR. cNOR состоят из 2 субъединиц: NorB и NorC, содержащих в своём составе гем-*b* и гем-*c* соответственно. Субъединица NorC обеспечивает транспорт электронов от молекул-доноров, в то время как на субъединице NorB с участием негемового железа происходит реакция восстановления монооксида азота до N₂O.

N₂O-редуктаза осуществляет последний этап процесса денитрификации, восстанавливая закись азота до N₂. У грамотрицательных бактерий это периплазматический фермент, в то время как у грамположительных он локализован на цитоплазматической мембране и обращён в периплазматическое пространство. Данная редуктаза представляет собой гомодимер, состоящий из 2 субъединиц NosZ (Zumft, 1997). Каждая из субъединиц несёт 1 медный центр, состоящий из 4 атомов меди, сшитых семью гистидиновыми остатками. При этом первая субъединица обеспечивает непрерывный транспорт электронов к активному центру фермента, а вторая непосредственно осуществляет процесс восстановления закиси азота.

1.2. Диссимиляционная нитратредукция до аммония

В отличие от денитрификации, диссимиляционная нитратредукция до аммония (ДНРА), как предполагается, происходит при недостатке нитрата в сравнении с органическим углеродом (Cole and Brown, 1980). При ДНРА ионы нитрата восстанавливаются до аммония, что сопровождается переносом восьми электронов через клеточную мембрану. На начальном этапе, как и при

денитрификации, нитрат восстанавливается до нитрита. Данная реакция осуществляется в основном периплазматической нитратредуктазой NarAB, хотя мембраносвязанная нитратредуктаза NarGHJ также может участвовать в процессе первичного восстановления нитратов (Richardson *et al.*, 2001). Дальнейшее восстановление нитрита до аммония катализируется пятигемовой цитохром-с нитритредуктазой NrfA напрямую, без каких либо промежуточных продуктов (Einsle *et al.*, 2000; Einsle *et al.*, 2002).

Способность выполнять ДНРА имеет широкое распространение среди различных групп прокариот. Функциональный ген ключевого фермента данного процесса находят у большого числа гамма-, дельта- и эпсилонпротеобактерий (Smith *et al.*, 2007).

В дыхательной ДНРА энергия образуется за счёт генерации электрохимического протонного потенциала на мембране. Электроны транспортируется от субстрата (например: водород, сульфид, формиат) на нитрит, восстанавливая атом азота и меняя его степень окисления с +4 до -2. ЭТЦ в этом случае состоит из фермента, который окисляет донор электронов, например НАДН дегидрогеназы или формиатдегидрогеназы, переносчика электронов и цитохром с нитритредуктазы NrfA. Сама нитритредуктаза ориентирована в периплазматическое пространство, поскольку здесь содержится нитрит – продукт работы периплазматической нитратредуктазы NarAB. Нитритредуктаза может быть заякорена на наружной стороне мембраны за счет субъединицы NrfHA, или же свободно перемещаться в периплазматическом пространстве (рис.12 А). При этом NrfH обеспечивает перенос электронов от ферментов ЭТЦ и удерживает весь комплекс на мембране (Kern *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2001).

У представителей разных групп микроорганизмов нитритредуктаза NrfA может быть связана с цитоплазматической мембраной и вовлечена в дыхательную цепь посредством различных вспомогательных ферментов *nrf* семейства (рис.12 Б).

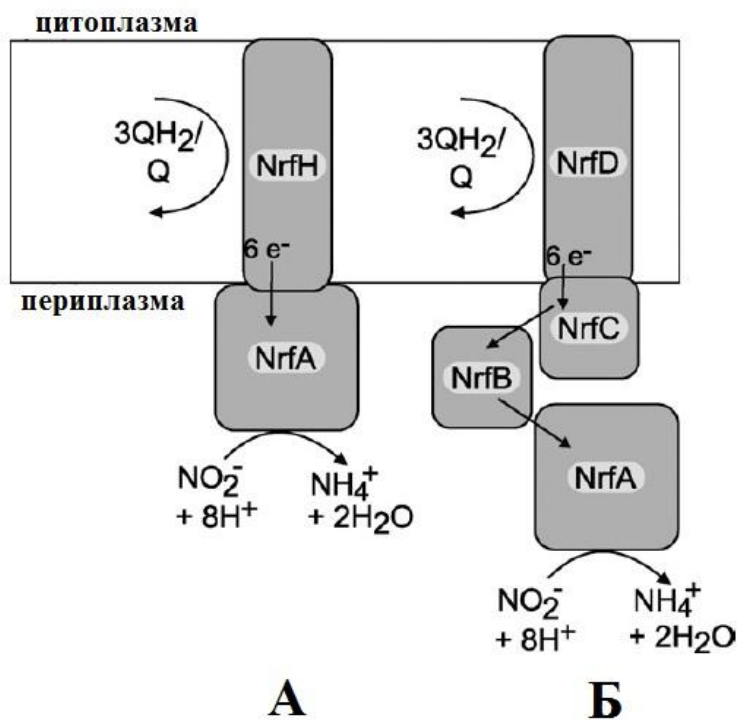


Рис. 12. Устройство и внутриклеточная локализация NrfA (А) и NrfABCD (Б) комплексов (Marietou *et al.*, 2009).

У некоторых гаммапротеобактерий нитритредуктаза NrfA представляет собой односубъединичный фермент, локализованный в периплазматическом пространстве.

Во всех случаях в процессе респираторной нитратредукции до аммония энергия генерируется посредством создания электрохимического протонного потенциала на мембране.

Большинство организмов, способных осуществлять реакцию шестиэлектронного восстановления нитрита до аммония также способны восстанавливать нитраты до нитритов. Однако некоторые сульфатвосстанавливающие бактерии способны использовать только нитриты (Dannenberg *et al.*, 1992).

Долгое время считалось, что диссимиляционная нитратредукция до аммония занимает несущественную позицию в круговороте азота в биосфере. Предполагалось, что основным процессом, снижающим количество нитратов в окружающей среде, наряду с аммонификацией, является респираторная денитрификация. Однако последние эксперименты с использованием N^{15}

радиоактивной метки говорят об обратном. Так, например, во влажных почвах тропических дождевых лесов процессу ДНРА подвергается до 75 % всего нитрата (Silver *et al.*, 2001).

1.3. АНАММОКС

Существуют бактерии, которые способны получать энергию при образовании газообразного азота из нитрата и аммония (Jetten *et al.*, 2005). С момента открытия данного метаболического пути по сегодняшний день было выделено и описано несколько видов бактерий, способных к АНАММОКС. Все они относятся к одному порядку *Planctomycetales* и имеют значительное эволюционное расстояние от других порядков (Jetten *et al.*, 2009). Это медленно растущие микроорганизмы, в норме увеличивающие свою биомассу вдвое за период от 11 дней до 3 недель. Также четыре «претендента» на новый род бактерий, способных к анаммокс, были выделены из активного ила: “Candidatus Kuenenia” (Schmid *et al.*, 2000; Strous *et al.*, 2006), “Candidatus Brocadia” (Strous *et al.*, 1999; Kuenen and Jetten, 2001; Kartal *et al.*, 2008) “Candidatus Anammoxoglobus” (Kartal *et al.*, 2007) и “Candidatus Jettenia” (Quan *et al.*, 2008). Пятый «претендент» на АНАММОКС - род “Candidatus Scalindua” (Kuypers *et al.*, 2003; Schmid *et al.*, 2003; VandeVosbergen *et al.*, 2008), часто обнаруживался в морских отложениях и средах с минимальным содержанием кислорода (Dalsgaard *et al.*, 2005; Penton *et al.*, 2006; Ferry J.G., 2006; Schmid *et al.*, 2007; Woebken *et al.*, 2008). В целом АНАММОКС-бактерии обнаружены во многих средах, имеющих микроаэробные и анаэробные зоны: морские и пресноводные отложения, морской лед, сточные воды.

Рассматривая данный процесс, следует выделить четыре отдельные химические реакции. Вначале нитрат восстанавливается до нитрита одной из диссимилиационных нитратредуктаз (Nar или Nap). Далее начинает работать цепь АНАММОКС-ферментов, осуществляющих восстановление нитрита и аммония до N_2 (рис. 13).

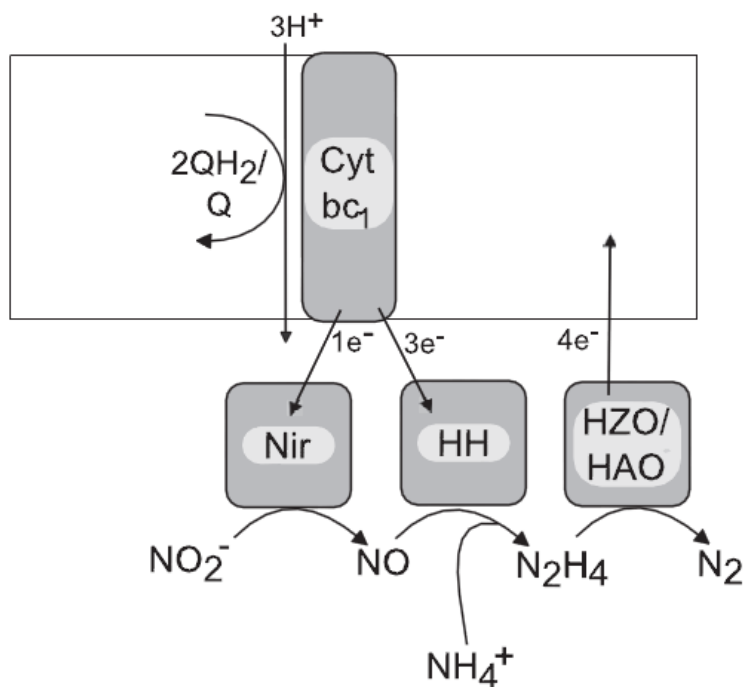


Рис. 13. Ферменты, осуществляющие АНАММОКС и общая схема процесса (Strous *et al.*, 2006).

Cyt bc₁ – цитохром bc₁ комплекс, Nir – нитритредуктаза, HH – гидразингидролаза, HZO / HAO – гидразин / гидроксиламиноредуктаза, Q – кофермент Q.

Из электронтранспортной цепи на уровне цитохрома bc₁ электроны попадают на нитритредуктазу и гидразингидролазу. При этом нитритредуктаза восстанавливает нитриты до монооксида азота, который является продуктом для следующей реакции. Гидразингидролаза, также получив электроны из ЭТЦ, образует из NO и NH₄⁺ молекулу гидразина.

1.4. Диссимиляционная нитратредуктаза NarGHI

1.4.1. Распространение

Диссимиляционная нитратредуктаза NarGHI (К.Ф. 1.7.5.1), бактериальный фермент, катализирующий реакцию двухэлектронного восстановления атома азота в молекуле нитрата.

Диссимиляционная нитратредуктаза NarGHI – фермент, широко распространенный среди прокариот (табл.1). Поскольку данная нитратредуктаза является необходимым компонентом метаболического пути

денитрификации, её можно обнаружить у многих микроорганизмов, способных к анаэробному росту на нитратах (Zumft, 1997).

Недавние исследования процесса дыхания у грибов показали возможность протекания процесса нитратредукции с участием диссимиляционной нитратредуктазы Nar. Фермент близок по строению к NarGH_I, имеет в своем составе молибден и пять железо-серных кластеров. Однако он кодируется другими генами, несходными по нуклеотидной последовательности с генами *narG*, *narH* и *narI* (Takaya, 2002).

Таким образом, по имеющимся на сегодняшний день данным диссимиляционная нитратредуктаза NarGH_I является исключительно прокариотическим ферментом, широко распространённым среди бактерий и архей.

1.4.2. Функции

Диссимиляционная нитратредуктаза NarGH_I синтезируется в клетках бактерий обычно в анаэробных или микроаэробных условиях, что позволяет использовать для дыхания альтернативные терминальные акцепторы электронов, например нитрат. При этом происходит укорочение ЭТЦ с конца с потерей одного пункта фосфорелирования.

Таким образом, единственной функцией нитратредуктазы NarGH_I в живой клетке является восстановление нитрата до нитрита в рамках процесса диссимиляционной нитратредукции в микроаэробных или анаэробных условиях. Следует отметить, что нитрат, не единственный субстрат NarGH_I. Лабораторные опыты показали, что данная молекула способна восстанавливать хлорат-ионы. При этом величина K_m для хлората и нитрата обычно соизмеримы (Zumft, 1997).

Однако в естественных условиях данная способность не востребована по причине отсутствия молекул хлората в окружающей среде в достаточном количестве.

1.4.3. Особенности структурной организации

Диссимиляционная нитратредуктаза NarGH_I представляет собой гетеротример с молекулярной массой от 160 до 310 кДа. Она состоит из трёх субъединиц: NarG (90 – 150 кДа), NarH (47 – 80 кДа), NarI (16 – 25кДа) (Zumft, 1997). Очищенный препарат нитратредуктазы может состоять из 2 субъединиц, поскольку субъединица NarI нередко теряется при механическом разрушении клеток и нагревании. Субъединица NarG – каталитическая, несет в себе атом молибдена и молибдоптерин (рис.14).

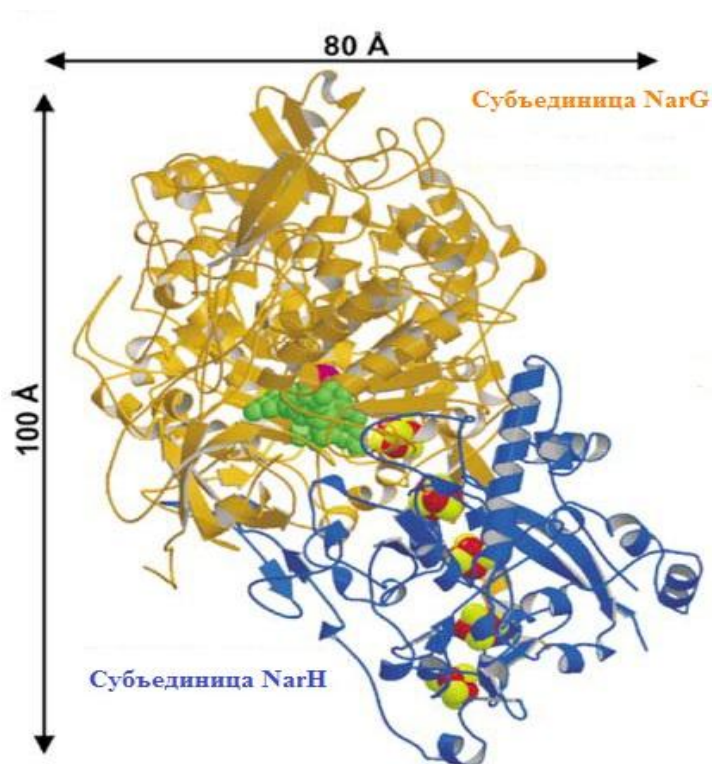


Рис. 14. Структура NarGH комплекса (Esnouf, 1997).

Субъединицы NarG (желтая) и NarH (синяя). В активном центре NarG несёт молибдоптерин (зелёный, атом молибдена розовый) и 4Fe-4S кластер. NarH несет четыре кластера (снизу вверх): [3Fe-4S] 3, [4Fe-4S] 2, [4Fe-4S] 4, [4Fe-4S] 1 (желто-красные).

В субъединице NarG можно выделить пять доменов. Первый домен (аминокислотные остатки 29 – 110 и 789 – 814) связывает 4Fe-4S кластер посредством трех остатков цистеина и одного гистидина. Домен II

(аминокислотные остатки 111 – 221, 699 – 788, 815 – 845, 944 – 959) и домен III (228 – 318 и 501 – 578) формируют активный центр фермента. Четвертый домен (1059 – 1246) формирует периферию активного центра и участвует в поддержании оптимального взаиморасположения железосерного кластера и молибдоптерина. Пятый домен (319 – 500, 579 – 698, 846 – 943, 960 – 1052) является самым большим в составе субъединицы и формирует канал, проводящий субстрат к активному центру фермента (рис. 15).

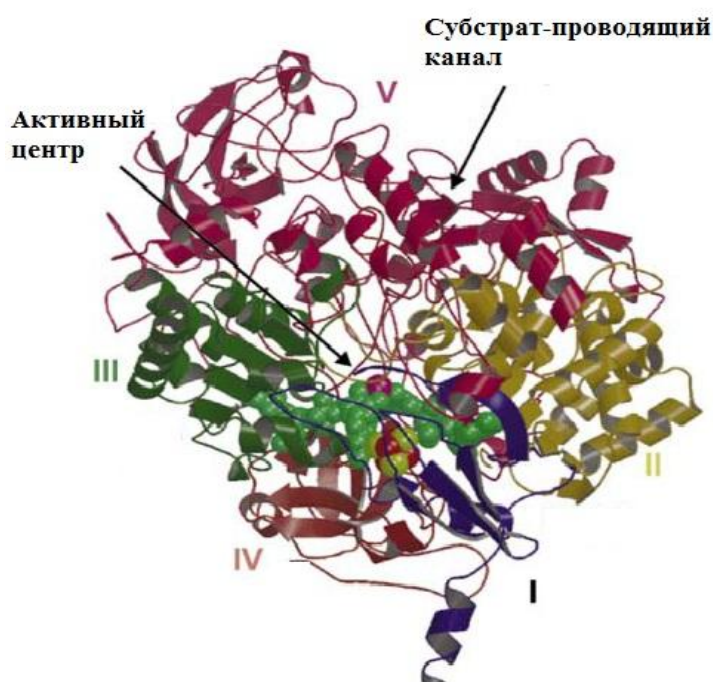


Рис. 15. Строение каталитической субъединицы NarG, участие отдельных доменов в формировании активного центра и субстрат-проводящего канала (Jormakka *et al.*, 2004).

Субъединица NarH осуществляет транспорт электронов по цепи железосерных кластеров. Окислительно-восстановительный потенциал кластеров представлен на рисунке 16 (Esnouf, 1997).

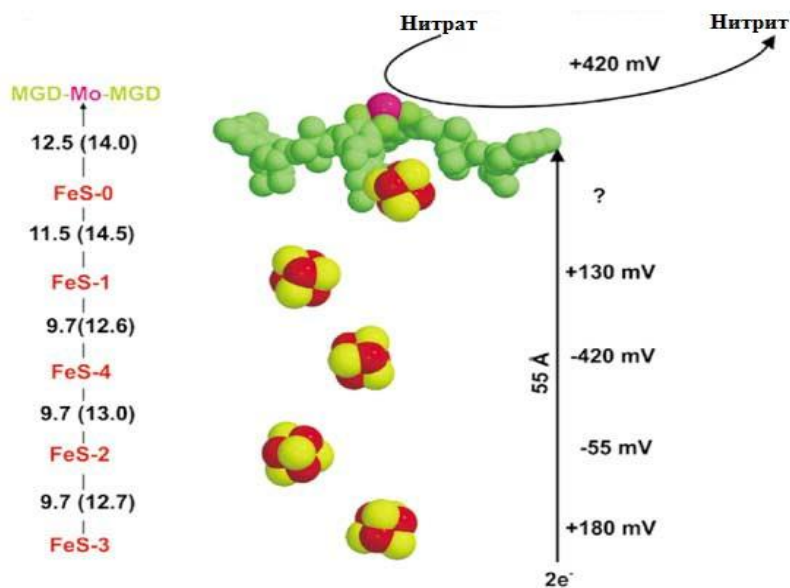


Рис. 16. Устройство и общий принцип работы функциональной части NarGH комплекса (Jormakka *et al.*, 2004).

Окислительно-восстановительный потенциал железо-серных кластеров и молибденового кофактора (справа). Расстояние между кластерами (центрами кластеров) слева.

Установлено, что кластеры работают в двух парах, по одному с низким и высоким потенциалом. Отсутствие хотя бы одного кластера значительно снижает скорость переноса электронов и всего процесса восстановления нитратов. К настоящему времени созданы достоверные модели, показывающие схему работы NarGH комплекса, однако скорость транспорта электронов, рассчитанная теоретически, значительно ниже реальной.

Субъединица NarI - интегрированный в мембрану белок, выполняющий функцию удержания всего ферментного комплекса на поверхности цитоплазматической мембраны с внутренней стороны (рис. 17). Помимо этого данная субъединица принимает электроны из ЭТЦ и передает их на NarH. Для этого на субъединице NarI имеется 2 гема.

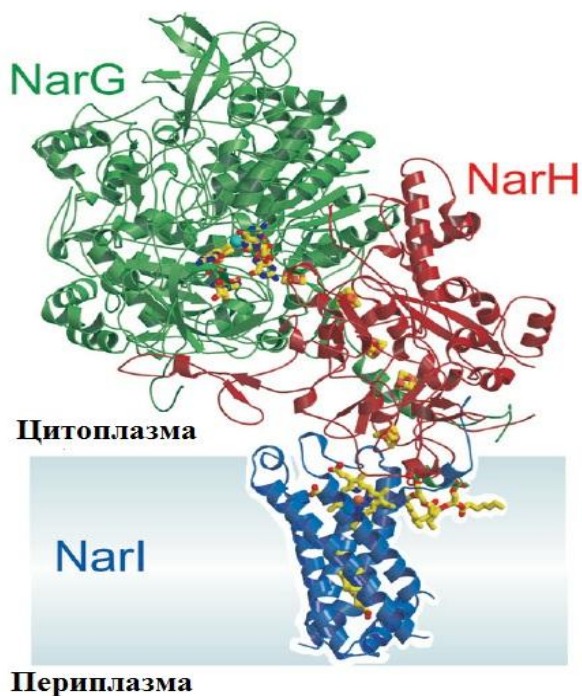


Рис. 17. Строение мембраносвязанной респираторной нитратредуктазы NarGHI (общий вид) и её внутриклеточная локализация (Bertero *et al.*, 2003).

1.4.4. Физико-химические свойства

В таблице 2 представлена сравнительная характеристика физико-химических характеристик респираторных нитратредуктазиз прокариот. Оптимум pH нитратредуктаз обычно расположен в нейтральных или слабощелочных значениях pH и может иметь значение от 6,0 до 8,5.

Температурный оптимум лежит в пределах от 40 до 80 °C и может отличаться у одного и того же белка при использовании разных доноров электронов. При этом фермент, выделенный из клеток архей, как правило, имеет более высокий температурный оптимум, чем его бактериальные аналоги. Так, температурный оптимум белка, выделенного из экстремального термофила *Pyrobaculum aerophilum*, составил более 95 °C (Afshar *et al.*, 2001).

Диссимиляционные нитратредуктазы из большинства микроорганизмов являются термостабильными ферментами.

Таблица 2. Физико-химические характеристики респираторных нитратредуктаз

Штамм	ММ с/ц, кДа	рН оптимум	Темпера- турный опт имум	Термостабильность	K_m NO_3 , мкМ
<i>Haloarcula marismortui</i> (Yoshimatsu <i>et al.</i> , 2000, 2002)	117, 47	н/о	н/о	н/о	79
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Carlson <i>et al.</i> , 1982)	118, 64	6,5-7,5	н/о	**10 мин при 65-70 °С, и более чем 90 мин при 50 °С без потери активности	300
* <i>Pseudomonas isachenkovii</i> (Antipov <i>et al.</i> , 1998)	130, 67	6,0-8,5	70 °С	н/о	н/о
* <i>Halomonas</i> sp. Strain AGJ 1-3 (Antipov <i>et al.</i> , 2005)	130	7,0	70-80 °С	100 мин при 50 °С – без потери активности; 35 мин при 70 °С – потеря 50 % активности	н/о
<i>Thioalkalivibrio nitratireducens</i> (Filimonenkov <i>et al.</i> , 2010)	140	7,0 при 30 °С 6,5-7,5 при 45 °С	50-55 °С	180 мин при 45 °С, 80 мин при 50 °С, 40 мин при 55 °С – потеря 50 % активности	220 ± 50
<i>Haloferax mediterranei</i> (Lledo <i>et al.</i> , 2004)	112, 61	7,9 при 40 °С 8,2 при 60 °С	70 °С	н/о	820 ± 140
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (Hettmann <i>et al.</i> , 2003)	130, 58	7,5-8,0	н/о	н/о	3200
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (Borcherding <i>et al.</i> , 2000)	ММ	7,5-8,5	76 °С	24 ч при 37 °С – без потери активности	490 ± 70
<i>Paracoccus denitrificans</i> (Craske and Ferguson, 1986; Forget, 1971)	121, 61, 21	7,5	н/о	н/о	300
<i>Pyrobaculum aerophilum</i> (Afshar <i>et al.</i> , 2001)	130 52 32	6,5	>95 °С	1,5 ч при 100 °С – потеря 50 % активности; **6 ч при 100 °С – потеря 50 % активности	58
<i>Xanthomonas maltophilia</i> (Ketchum and Payne, 1992)	135, 64, 23	н/о	н/о	н/о	н/о
<i>Haloferax denitrificans</i> (Hochstein and Lang, 1991)	116, 60	7,2	н/о	н/о	190

* – данные нитратредуктазы относятся к классу ферментов, не содержащих в активном центре атом молибдена;

** – измерения проводились на неочищенном препарате.

Хотя данные сильно разнятся, можно найти несколько нитратредуктаз, для которых при инкубации на 70 °С период полуинактивации (потери 50 % активности от начальной величины) достигает 30 – 35 минут (Antipov *et al.*, 2005). Белок из штамма *Pseudomonas aeruginosa* при инкубации при 65-70 °С сохранял свою начальную активность в течение 10 минут (Carlson *et al.*, 1982). Время полуинактивации нитратредуктазы из *Pyrobaculum aerophilum* при 100 °С составляло 1,5 час (Afshar *et al.*, 2001). Существует пример менее стабильных ферментов. Белок из *Thioalkalivibrio nitratireducens* сохранял 50 % начальной активности при инкубировании при 55 °С в течение 40 минут. Стоит отметить, что для указанного белка характерна термоактивация (Filimonenkov *et al.*, 2010).

Эффективными ингибиторами диссимиляционных нитратредуктаз выступают соединения азида и цианида. Азид выступает в качестве конкурентного ингибитора, а цианид – неконкурентного ингибитора по отношению к нитрату (Hochstein and Tomlinson, 1988).

Полагают, что ингибирующее действие азида и цианида определяется их хелатирующими свойствами по отношению к атому молибдена, расположенному в активном центре нитратредуктазы (McDonald and Coddington, 1974), однако детальный механизм ингибирования не исследован. Соединениями, снижающими активность нитратредуктазы, также выступают ДТТ и ЭДТА. Так, для фермента из *Haloferax mediterranei* показано снижение активности на 24 % и 22 % при добавлении в реакционную среду 1 мМ ДТТ и ЭДТА, соответственно (Lledo *et al.*, 2004). Данные по влиянию различных ингибиторов на активность фермента представлены в таблице 3.

Хлорид-ионы оказывают влияние на активность и стабильность диссимиляционных нитратредуктаз. В основном высокие концентрации NaCl (2 М и выше) оказывают ингибирующий эффект на активность ферментов, тогда как концентрация в 1М не влияет на активность (табл. 3).

Таблица 3. Влияние различных соединений на активность нитратредуктаз

Штамм	Ингибиторы	Влияние ионов Cl
<i>Haloarcula marismortui</i> (Yoshimatsu <i>et al.</i> , 2000; 2002)	н/о	0 М NaCl: $k_{cat}=71^*$ 2 М NaCl: $k_{cat}=145^*$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Carlson <i>et al.</i> , 1982)	Азид: $IC_{50} - 21-24$ мкМ, $K_i = 2,0$ мкМ	н/о
<i>Pseudomonas isachenkovii</i> (Antipov <i>et al.</i> , 1998)	Азид: $IC_{50} - 60$ мкМ. Цианид: $IC_{50} - 70$ мкМ	н/о
<i>Halomonas</i> sp. Strain AGJ 1-3 (Antipov <i>et al.</i> , 2005)	Азид: $IC_{50} - 36$ мкМ. Цианид: $IC_{50} - 110$ мкМ	0,5-3,5 М NaCl – 60 % от максимальной активности, 4,5 М NaCl – 40 % от максимальной активности
<i>Thioalkalivibrio nitratireducens</i> (Filimonenkov <i>et al.</i> , 2010)	Азид: $IC_{50} - 3,4$ мкМ. Цианид: $IC_{50} - 24,3$ мкМ	4,5 М NaCl – 70 % от максимальной активности
<i>Haloferax mediterranei</i> (Lledo <i>et al.</i> , 2004)	1 мМ ДТТ: 75.45 %, 1 мМ ЭДТА: 77.8 %, 1 мМ азид: 31,6 %, 1 мМ цианид: 24 % от максимальной активности	3,5 М NaCl – отсутствие ингибирования после 170 ч инкубации, 2,5 М, 1,5 М и 0,5 М NaCl – потеря 7 % начальной активности после 170 ч инкубации
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (Hettmann <i>et al.</i> , 2003)	н/о	До 1М NaCl – отсутствие ингибирования, До 100 мМ NaClO ₃ – отсутствие ингибирования
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (Borcherding <i>et al.</i> , 2000)	н/о	До 1 М NaCl – отсутствие ингибирования
<i>Paracoccus denitrificans</i> (Craske and Ferguson, 1986; Forget, 1971)	Азид: $K_i = 0,55$ мкМ	н/о
<i>Pyrobaculum aerophilum</i> (Afshar <i>et al.</i> , 2001)	Азид: $K_i = 31$ мкМ Цианид снижал V_{max} в 3 раза (с 326 Е/мг до 108 Е/мг)	н/о
<i>Xanthomonas maltophilia</i> (Ketchum and Payne, 1992)	н/о	н/о
<i>Haloferax denitrificans</i> (Hochstein and Lang, 1991)	Азид: $K_i = 0,7$ мкМ. ClO ₃ : $K_i = 800$ мкМ. Цианид: $K_i = 500$ мкМ	4 М NaCl – 46 % от максимальной активности

* – моль NO₂⁻ на 0,5 моль 117 кДа пептида за 1 секунду

Для нитратредуктазы из *Haloferaxme diterranei* показан стабилизирующий эффект ионами хлора. Хранение фермента при 4 °С в буфере без NaCl в течение 170 ч приводило к потере активности ферментов – до 10 % начальной активности. Присутствие 3,5 М NaCl в буфере приводило к сохранению начальной активности в тех же условиях (Lledo *et al.*, 2004). Стоит отметить, что стабильность нитратредуктазы из *Haloarcula marismortui* не зависела от присутствия ионов хлора. Однако, при повышении концентрации NaCl до 2 М, активность фермента возрастала, а при дальнейшем повышении концентрации NaCl до 4 М снижалась. Но даже при 4 М NaCl она была выше, чем активность при полном отсутствии NaCl в реакционной среде (Yoshimatsu *et al.*, 2000).

1.4.5. Устройство генного кластера *nar*, сборка фермента, регуляция экспрессии

Структурные гены, кодирующие респираторную нитратредуктазу, впервые были секвенированы у *E. coli*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens* (Blasco *et al.*, 1989; Hoffmann *et al.*, 1995; Philippot *et l.*, 1997).

Гены *nar* организованы в оперон с другими генами, кодирующими шаперон-подобные белки, необходимыми для созревания $\alpha\beta$ -комплекса и сборки $\alpha\beta\gamma$ -структуры. Таким шапероном выступает белок NarJ.

Установлено, что NarJ связывается с субъединицей NarG и поддерживает её в «каталитически-активном» состоянии, в котором к данной субъединице присоединяется атом молибдена, и таким образом происходит формирование активного центра фермента. Затем NarJ отсоединяется от активированного фермента (Blasco *et al.*, 1998). Оперон *nar* часто связан, по крайней мере, с одним *narK* геном, кодирующим белки, относящиеся к семейству трансмембранных транспортеров (Marger and Saier, 1993) (рис. 18). Механизм сборки диссимиляционной нитратредуктазы в общем виде выглядит следующим образом: созревание субъединицы NarI происходит в мембране, где два гема *b*-типа последовательно встраиваются в его структуру.

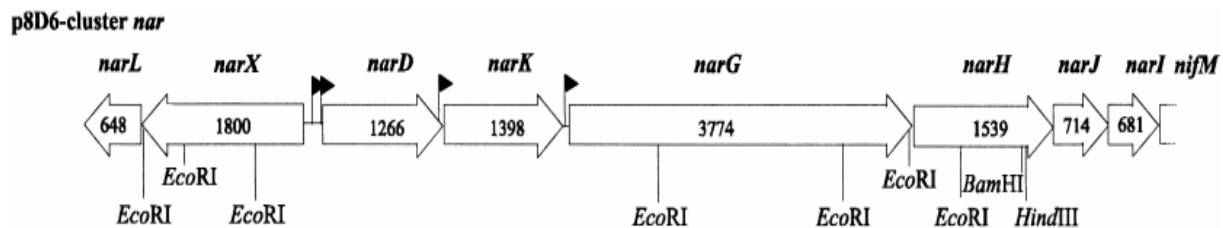


Рис. 18. Организация кластера *nar* у *Pseudomonas fluorescens* C7R12 (Philippot *et al.*, 2001).

Число нуклеотидов указано для каждого гена. Вертикальные флажки указывают на положение и направление сайтов узнавания для белка-гомолога Fnr.

Одновременно с этим, комплекс NarGH стабилизируется белком-шапероном NarJ в цитоплазме. В дальнейшем, сначала происходит встраивание четырёх Fe-S-кластеров в субъединицу NarH, а затем происходит встраивание кофактора Мосо (молибдоптерин) и 4Fe-4S-кластера (FS0) в субъединицу NarG посредством белка-шаперона NarJ. После полного созревания комплекса NarGH, NarJ отсоединяется и происходит закоривание димера в мембране (рис. 19) (Lanciano *et al.*, 2007).

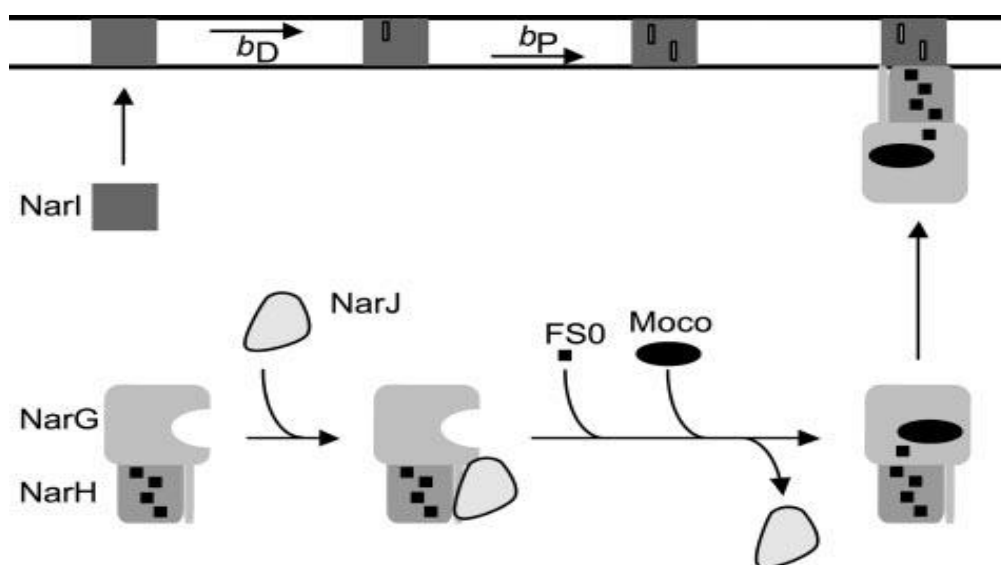


Рис. 19. Механизм сборки комплекса NarGHI (Lanciano *et al.*,

У бактерий экспрессия *nar* оперона индуцируется анаэробиезом или присутствием нитрата или нитрита (Philippot *et al.*, 2001). Для бактерий *E. coli* и *B. Subtilis* показано участие в регуляции экспрессии нитратредуктазы на уровне транскрипции регуляторного белка Fnr. Функциональный гомолог Fnr-белка обнаружен у факультативно анаэробных протеобактерий и предположительно у грамм-положительных бактерий (Unden *et al.*, 1995). В дополнении к этому, экспрессия оперона *nar* обеспечивается посредством генов *narXL*, кодирующих двухкомпонентную регуляторную систему (Hartig *et al.*, 1999). Ген *narX* детектирует присутствие NO_3^- и NO_2^- в периплазме. Ген *narL* кодирует ответный регулятор, который связывается с ДНК и активирует транскрипцию *narG*, *narK*, и *dnrE*. Последний представляет собой транскрипционный регулятор, относящийся к семейству FNR.

1.5. Характеристика рода *Thiothrix*

Поскольку объектом наших исследований были представители рода *Thiothrix*, то мы сочли необходимым рассмотреть характеристику представителей этого рода в обзоре литературы.

Все исследованные штаммы *Thiothrix* традиционно относят к аэробным или микроаэрофильным организмам. По типу метаболизма их можно отнести к факультативно автотрофным, хемоорганотрофным и миксотрофным видам, последние нуждаются в каких-либо органических соединениях (органические кислоты, углеводы, спирты, аминокислоты), также как и в восстановленных соединениях серы (Романова, 1980). В присутствии восстановленных соединений серы внутриклеточно откладывается элементная сера. Показана способность к фиксации молекулярного азота несколькими JP штаммами *T. nivea*, включая неотип рода *T. nivea* (Larkin, 1989), а также штамм *T. caldifontis* G1.

Нитчатые бактерии рода *Thiothrix*, окисляющие соединения серы, обладают выраженным слизистым чехлом, способны формировать розетки и размножаются с помощью гонидий (Дубинина, 1989).

В последние годы значительно расширился круг микроорганизмов, относящихся к роду *Thiothrix*, что позволило получить новые данные по физиологии, биохимии и таксономии (табл. 4).

Некоторые новые виды не обладают характерными свойствами рода: не формируют розеток (*T. eikelboomii* типовой штамм AP3), отсутствует общий слизистый чехол (*T. defluvii*, *T. eikelboomii*, *T. unzii*, *T. disciformis*, *T. flexilis*), некоторые наряду с гонидиями при фрагментации трихома способны формировать гормогонии (*Thiothrix ramosa*, *Thiothrix arctophila*) (табл. 3). Aruga с коллегами, учитывая результаты исследования последних лет, предложили внести изменения в характеристику рода *Thiothrix* (Aruga *et al.*, 2002; Winogradsky, 1888; Howarth *et al.*, 1999): к формальному описанию добавляются модификации размера клетки (клетки в диаметре составляют 0,7-4,0 мкм и в длину 0,7-5,5 мкм) и производства гонидий (гонидии продуцируются на концевых участках филаментов у некоторых штаммов)

Таблица 4. Морфологические характеристики видов *Thiothrix*^{a,б}

Виды <i>Thiothrix</i>		Характеристики				
		Диаметр клетки, мкм	Формирование:			Образование общего чехла
			розеток	гонидий	гормогоний	
Тип 021N	<i>T. defluvii</i>	1,0-2,0 1,0-2,0* 2,0-4,0**	+	+	-	-
	<i>T. eikelboomii</i>	0,6-0,8* 1,0-3,0**	±***	+	-	-
	<i>T. disciformis</i>	1,2-3,0	нд	нд	нд	-
	<i>T. flexilis</i>	1,0-4,0	±	+	-	-
<i>T. nivea</i> группа	<i>T. nivea</i>	0,7-2,6	+	+	-	+
	<i>T. fructosivorans</i>	1,2-2,5	+	+	-	+
	<i>T. ramosa</i>	0,7-2,5	+	+	+	+
	<i>T. arctophila</i>	0,7-2,6	+	+	+	+
	<i>T. unzii</i>	0,7-1,5	+	+	-	-
	<i>T. lacustris</i>	0,9-2,3	+	+	-	+
	<i>T. caldifontis</i>	0,9-2,2	+	+	-	+

Примечание: ^a - характеристики *Thiothrix* СТЗ, *Thiothrix disciformis* не приводятся из-за их отсутствия; ^б - цитировано по (Unz and Head, 2004); * - апикальные клетки; ** - клетки у основания трихома; *** - розетки не формирует типовой штамм; ± - реакция варьирует у разных штаммов в пределах вида.

1.5.1. Таксономический состав и филогенетическое положение

За последние десятилетия проводился комплекс молекулярно-биологических и микробиологических работ в области исследования фенотипов представителей рода *Thiothrix* и их генетического анализа. Выводы, полученные на основе анализа результатов исследований, подтвердили филогенетическую гетерогенность данного таксона (Kanagawa *et al.*, 2000; Aruga *et al.*, 2002).

Род *Thiothrix* включает девять видов, разделяемых на две обособленные группы организмов: группа «*T. nivea*» (*T. nivea*, *T. fructosivorans*, *T. unzii*, *T. lacustris* и *T. caldifontis*) и группа «Eikelboomtype 021N» (*T. eikelboomii*, *T. disciformis* и *T. flexilis*) (Larkin J.M., 1990). В основе данного подразделения лежат особенности фенотипа, а также данные молекулярно-биологических исследований. Вид *T. defluvii*, не упомянутый выше, филогенетически более близок к виду *T. flexilis*, однако определение его видового статуса основано только на результатах анализа гена 16S рРНК (Aruga *et al.*, 2002).

Положение группы «Eikelboomtype 021N» в системе рода *Thiothrix* является предметом обсуждения и на настоящий момент не определено конкретно (Kanagawa *et al.*, 2000; Aruga *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 1994; Gohet *et al.*, 2006). Содержание ГЦ-пар в ДНК группы «Eikelboomtype 021N» отличаются от такового группы «*T. nivea*». Анализ 16S рРНК показывает степень сходства между членами вышеупомянутых групп 92 % и менее. К тому же по ряду морфологических признаков эти группы стоят обособленно. В связи с этим выступали предложения о выделении представителей группы «Eikelboom type 021N» в отдельный новый род. Более того, Wagner (Wagner *et al.*, 1994), Kanagawa (Kanagawa *et al.*, 2000) и Aruga (Aruga *et al.*, 2002) не исключали вероятность выделения видов *T. eikelboomii*, *T. disciformis* и *T. flexilis* в ранг самостоятельных родов (Дубинина Г. А., 1989). Эти заключения были сделаны на основе анализа последовательностей генов 16S рРНК, которые показывали 90,6–94,5 % сходства внутри самой группы. С другой

стороны, работа, проведенная Howarth с коллегами (Howarth *et al.*, 1999), указывала на общность групп серобактерий «*T. nivea*» и «Eikelboomtype 021N» на родовом уровне.

Анализ филогенетического дерева, построенного на основе последовательностей 16S рРНК бактерии рода *Thiothrix*, выявляет единый глубокий монофилетический кластер в составе семейства *Thiotrichaceae*. Исследование вторичных структур генов 16S рРНК выявило общие делеции в области 455–472 нуклеотидов у видов *T. nivea*, *T. unzii*, *T. fructosivorans*, *T. defluvii*, *T. disciformis* и *T. eikelboomii*. Сходных особенностей во вторичной структуре 16S рРНК у представителей ближайших к роду таксонов выявлено не было.

К тому же морфологические признаки представителей групп «*T. nivea*» и «Eikelboomtype 021N» очень вариабельны и во многом зависят от условий культивирования, поэтому нельзя опираться лишь на данный признак, как ключевой в достоверном таксономическом определении. Всё это указывает на ограниченность существующих знаний о филогении серобактерий рода *Thiothrix*.

Недавно были получены данные фенотипического и филогенетического характера, подтверждающие общность происхождения и филогенетического единства представителей групп «*T. nivea*» и «Eikelboom type 021N» в составе рода *Thiothrix* (Черноусова и др., 2012). Это заключение авторы объясняют следующим:

1) вариабельностью морфологических и физиологических свойств, присущей членам групп «*T. nivea*» и «Eikelboom type 021N». Несмотря на морфофизиологическую обособленность групп «*T. nivea*» и «Eikelboom type 021N», некоторые виды охарактеризовались нетипичными для своей группы фенотипическими признаками, сближающими эти группы. Содержание Г+Ц-оснований в ДНК у представителей групп «*T. nivea*» и «Eikelboom type 021N» составляет 49–52 % и 44–46 %, соответственно. Это согласуется с общепринятыми представлениями о пределах колебаний молярных процентов

Г+Ц в ДНК членов одного рода. Исследования, касающиеся определения допустимого уровня различий нуклеотидного состава ДНК для бактериальных таксонов показали, что различия Г+Ц состава между членами одного вида не могут превышать 5 %, а между членами одного рода не более 10 % (Dale and Park, 2010);

2) на филогенетических деревьях, построенных на основании данных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (рис. 20) и транслированных аминокислотных последовательностей гена *gyrB* (рис. 21), члены групп «*T. nivea*» и «Eikelboom type 021N» формировали общий глубокий кластер в составе семейства *Thiotrichaceae* и порядка *Thiotrichales*, соответственно.

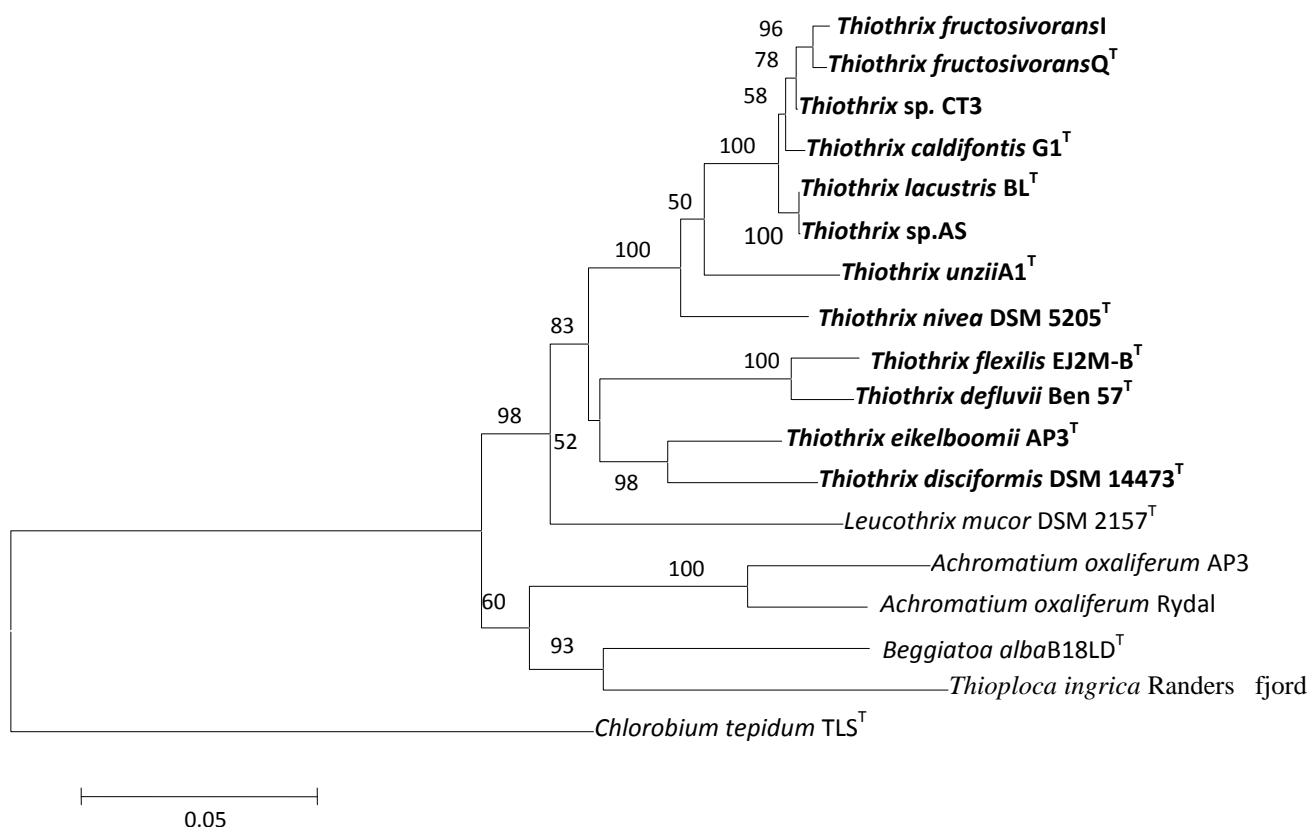


Рис. 20. Филогенетическое дерево на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК представителей членов семейства *Thiotrichaceae*, родственных роду *Thiothrix* (Черноусова и др., 2012).

Однако, при сопоставлении дендрограмм, полученных на основании результатов анализа обоих типов данных, были обнаружены несоответствия в положениях отдельных видов внутри этого общего кластера. Это свидетельствовало о существовании внутренней генетической гетерогенности рода *Thiothrix*;

3) общность происхождения и филогенетическое единство видов *Thiothrix* подтверждаются результатами сравнительного анализа вторичных структур 16S рРНК, формирующих в значительной степени сходные вторичные структуры V3 переменного региона (рис. 22).

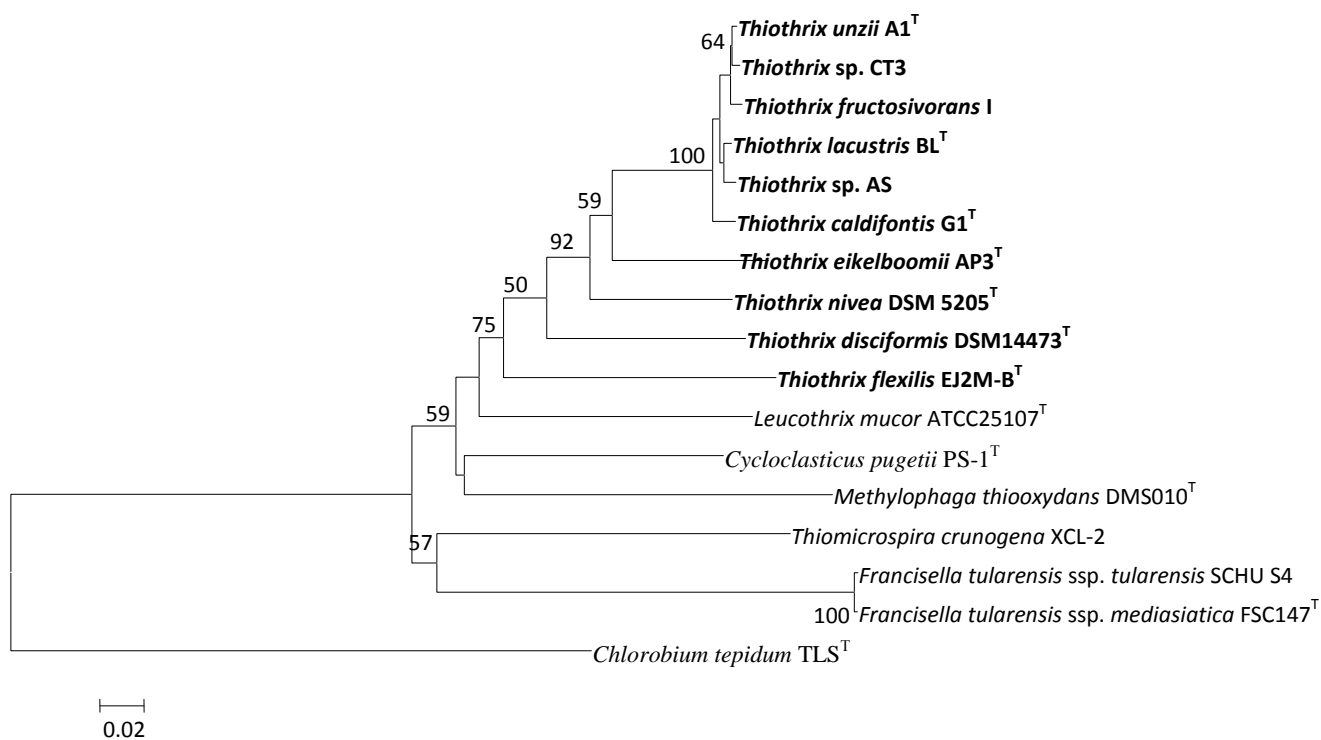


Рис. 21. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей генов *gnrB* (Черноусова и др., 2012).

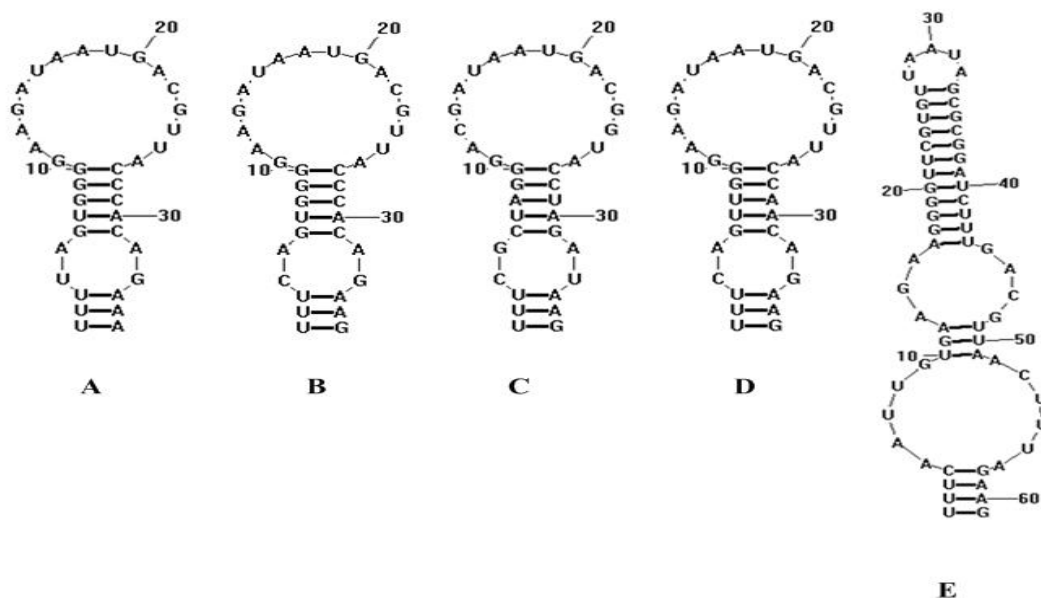


Рис. 22. Предполагаемые вторичные структуры варибельного региона V3 (позиции 437–497 по номенклатуре *E. coli*) видов рода *Thiothrix* (A, B, C, D) и *Leucothrixmucor* (E) (Черноусова и др., 2012).

Вторичные структуры: A – *T. eikelboomii*; B – *T. nivea*; C – *T. defluvii* и *T. flexilis*; D – *T. unzii* A1, *T. fructosivorans*, *T. caldifontis*, *T. lacustris*BL, *Thiothrix lacustris* AS и *Thiothrix*sp.CT3.

Таким образом, выявленное разнообразие групп «*T. nivea*» и «Eikelboom type 021N» на уровне фенотипа и генотипа является, вероятно, проявлением внутриродовой изменчивости на данном этапе эволюции рода *Thiothrix*, а не результатом макроэволюционных процессов, приводящих к формированию новых таксонов родового ранга. Следовательно, члены групп «*T. nivea*» и «Eikelboom type 021N» представляют совокупность различных видов в составе единого рода *Thiothrix*. В пределах группы «Eikelboom type 021N» было выявлено расхождение между данными генотипического и фенотипического анализа. Существование достаточно выраженной генетической гетерогенности у видов *T. eikelboomii*, *T. flexilis* и *T. disciformis*, имеющих сходные фенотипы, может свидетельствовать о накоплениях в ходе эволюции нейтральных изменений в их нуклеотидных последовательностях, обнаруживаемых с помощью генетических методов, и не сопровождающихся аналогичными изменениями на уровне фенотипа (Черноусова и др., 2012). Судьба подобных изменений в значительной степени определяется

стохастическими процессами, и любая генетическая гетерогенность в популяции является переходным состоянием между закреплением признака и его потерей (Лукашов, 2009). Теоретически этот процесс может сопровождать образованием новых таксонов в ходе эволюции.

1.5.2. Экология

Условия существования бактерий рода *Thiothrix* весьма разнообразны, начиная с сульфидсодержащих природных вод и систем ирригации и заканчивая активированным илом в очистных сооружениях. *Thiothrix* живет как прикрепленный организм в проточной воде, которая содержит в довольно высоких концентрациях оба компонента: H_2S и O_2 (Розанова, 1999). В подобных условиях нити *Thiothrix* существуют в условиях, при которых концентрации этих веществ (кислород и сероводород) значительно меняются за короткий промежуток времени (Грабович, 2005). Как правило, содержание O_2 в зонах роста *Thiothrix* может меняться от полного насыщения до 10 % от насыщения.

Приток H_2S в зону роста этих бактерий происходит либо из придонных слоев донных отложений (на мелководьях озер, в прудах, морских литоральях), либо из подводных гидротермальных источников (Одинцова, 1990). Последнее имеет место в районах подводных гидротерм в океанических условиях (Намсараев и др., 1994; Jannasch and Nelson, 1984; Jacquetal., 1989; Stein, 1984). Концентрация сероводорода может значительно варьировать – от долей мг/л до нескольких мг (Одинцова Е. В., 1993).

Среди представителей рода *Thiothrix* обнаружены и экзосимбионты (ротовая полость креветки *Rimicaris exoculata*) (Пименов и др., 1992; Gebruk *et al.*, 1993). Gillan и Dubilier с применением сравнительного анализа 16S рРНК и гибридизации *in situ* показали, что *Thiothrix* процветает в морских осадках как эпибионт амфипод (свободно живущий рачок *Urothoe poseidonis*) (Gillan and Dubilier, 2004).

1.6 Заключение по обзору литературы

Представители нитчатых бесцветных серобактерий рода *Thiothrix* широко распространены в разнообразных биотопах, характеризующихся наличием сероводорода: в сульфидных источниках, в районах гидротермальной активности пресноводных и морских водоемов, системах ирригации, в промышленных и бытовых водах очистных сооружений. Их развитие в природных средах сопровождается образованием обильных обрастаний.

Как правило, массовое развитие *Thiothrix* обнаруживается в экосистемах, характеризующихся одновременным присутствием кислорода и сероводорода и нестабильными окислительно-восстановительными условиями. Содержание растворенного кислорода в воде в зонах роста *Thiothrix* может меняться от насыщения до нескольких долей мг в 1 л и иногда не выявляется аналитически.

подавляющее большинство бесцветных серобактерий принадлежит к аэробам, но, оказавшись в анаэробных условиях, некоторые представители родов *Beggiatoa*, *Thiomargarita* и *Thioploca* способны переключаться на анаэробное дыхание с использованием нитратов в качестве терминальных акцепторов электронов (Schulz, 2006, Teske and Nelson, 2006). В связи с этим бактерии этих родов оказались важным связующим звеном между циклами серы, азота и углерода.

Способность к анаэробному росту предполагает наличие соответствующих метаболических путей и ферментативных систем. В частности, для дыхания на нитратах организм должен обладать целым набором специальных белков, среди которых можно выделить диссимиляционные нитратредуктазы и транспортные белки. На момент написания данной работы, каких либо сведений о наличии у бактерий рода *Thiothrix* ферментов диссимиляционной нитратредукции не было найдено.

Бесцветные серобактерии представляют группу микроорганизмов, широко распространенную в водоемах разного типа – пресных, морских, в районах океанических гидротерм и в антропогенных экосистемах, где из-за присутствия сероводорода могут создаваться анаэробные условия. В этой связи исследование нитратного дыхания и изучение респираторной нитратредуктазы бактерий рода *Thiothrix* выглядит интересной и актуальной задачей как в области биохимии, так и микробиологии.

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы, приборы, реактивы, интернет-ресурсы

2.1.1. Используемые реактивы

Нитрат серебра (Aldrich, США); тритонX-100, азид натрия, реактив Брэдфорда, бромфеноловый синий (Sigma, США); ЭДТА двунариевая соль, (Fluka, Германия); гидроксид натрия, тиосульфат натрия, карбонат натрия, гидрокарбонат натрия, хлорид кальция (Реахим, Россия); глицерин, Трис-НСl; ледяная уксусная кислота, (Panreac, Испания). Агароза, изопропанол, этанол, хлороформ, дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ, магния хлорид, TaqДНК-полимераза, обратная транскриптаза MMulV (RevertAid™), ингибитор рибонуклеаз, трис-НСl, Н₃ВО₃, глицерин, НСl, лизоцим, агароза для электрофореза, QSepharose, бычий сывороточный альбумин (BSA), бромистый этидий, SDS, акриламид, персульфат аммония, реактив Несслера, хромотроповая кислота, метилвеологен, дитионит натрия, N,N'-метилен-бисакриламид.

2.1.2. Буферные растворы и реакционные смеси

Буферы для электрофореза в агарозном геле:

– TBE: 89 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 0,89 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА-Na;

– 6-кратный sample-буфер для нанесения на гель образцов ДНК: 0,25 % бромфеноловый синий, 30 % глицерин.

Реакционные смеси для электрофореза в полиакриламидном геле:

– концентрирующий гель: 4 % акриламид-метиленбисакриламид; 0,125 М Трис-НСl рН 6,8; 0,1 % SDS; 0,075 % TEMED; 0,1 % персульфат аммония.

– разделяющего гель: 12 % акриламид-метиленбисакриламид; 0,375 М Трис-НСl рН 8,8; 0,1 % SDS; 0,085 % TEMED, 0,114 % персульфат аммония.

– электродный буфер (рН 8,3): 0,025 М Трис; 0,0192 глицин; 0,1 % SDS.

– буфер для образцов: 0,0625 М Трис-НСl pH 6,8; 2 % SDS; 10 % глицерин; 5 % β -меркаптоэтанол; 0,04 % бромфеноловый синий.

TE-буфер для растворения ДНК: 10 мМ Трис-НСl (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА-Na.

Буфер А: 50 мМ Трис-НСl (pH 7,35), 100 мМ NaCl.

Реакционная смесь Б: 0,2 М натрий-фосфатный буфер (pH 7,3), 0,01 М NaNO₃, 0,01 М метилвиологен.

Буфер для ревертазы (250 мМ Трис-НСl, pH 8,3, 250 мМ KCl, 20 мМ MgCl₂ и 50 мМ ДТТ)

2.1.3. Препараты ДНК

Маркеры ДНК MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, Литва)

Маркеры ДНК MassRuler Low Range DNA Ladder (Fermentas, Литва)

Маркеры ДНК O'GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Scientific, Литва).

Маркеры ДНК O'GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Scientific, Литва).

Маркеры ДНК O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Scientific, Литва).

Маркеры ДНК Hyper Ladder IV 100–1000 пар нуклеотидов (“Bioline”, Россия).

Праймеры, используемые в работе (табл. 5.)

2.1.4. Белковые маркеры

Маркеры белковые Protein Marker, Broad Range (2-212 kDa) (BioLabs, Англия). Маркеры белковые High Molecular Weight Native Marker Kit (GE Healthcare)

Таблица 5. Праймеры, используемые в работе

Ген	Название праймера	Нуклеотидная последовательность (5'-3')	Ссылка на статью
<i>narG</i>	narG1960F	TAYGTSGGCCARGARAA	Smithet <i>al.</i> , 2007
	narG2659R	TTYTCRTACCABGTBGC	Smithet <i>al.</i> , 2007
<i>nrfA</i>	nrfAF1	GCNTGYTGGWSNTGYAA	Smithet <i>al.</i> , 2007
	nrfA7R1	TWNGGCATRTGRCARTC	Smithet <i>al.</i> , 2007
<i>nirS</i>	nirS1F-E7	CCTA(C/T)TGGCCGCC(A/G)CA(A/G)T	Braker <i>et al.</i> , 1998
	nirS6R-F7	CGTTGAACTT(A/G)CCGGT	Braker <i>et al.</i> , 1998
	nirS_AS-F	GAGTTCATCGTCAACGT	This work
	nirS_AS-R	GGGTGCGTCTTGATGAA	This work
<i>nirK</i>	nirK1F	GGCAT(G/A)T(G/C)G(G/T)CC(G/T)CCGGCA	Braker <i>et al.</i> , 1998
	nirK5R	GCCTCGATCAG(A/G)TT(A/G)TGG	Braker <i>et al.</i> , 1998
<i>cnorB</i>	cnorB2F	GACAAGNNNTACTGGTGGT	Braker & Tiedje, 2003
	cnorB6R	GAANCCCCANACNCCNGC	Braker & Tiedje, 2003
	cnorB ThF	GATTACYGGCATYATYGGTACAGG	This work
	cnorB ThR	GCCARTACSGCYGTMCCCA TTGCCACACA	This work
<i>qnorB</i>	qnorB2F	GGNCAYCARGGNTAYGA	Braker & Tiedje, 2003
	qnorB7R	GGNGGRTT DATCADGAANCC	Braker & Tiedje, 2003
<i>nosZ</i>	nos661F	CGGCTGGGGGCTGACCAA	Scala&Kerkhof, 1998
	nos1773R	ATRTCGATCARCTGBTCGTT	Scala&Kerkhof, 1998
	nosZF	CGCTGTTTCITCGACAGYCAG	Rich <i>et al.</i> , 2003
	nosZR	ATGTGCAKIGCRTGGCAGAA	Rich <i>et al.</i> , 2003

2.1.5. Оборудование, программы, интернет-ресурсы

2.1.5.1. Оборудование

Детектирующий амплификатор ДТ-322 (ДНК-Технология, Россия), программируемый ДНК-амплификатор MJMini (Bio-Rad, США), источник питания Эльф-4 (ДНК-технология, Россия), аппарат для электрофореза Mini-Sub Cell GT System (BioRad, США). Система гель-документирования: камера CF 20 DXC Air, модуль ACC1 (Kappa messtechnik, Германия), спектрофотометр UV-1650 PC (Shimadzu, Япония), центрифуга настольная CM-50 (Elmi, Латвия), ультрафиолетовый транс-иллюминатор TSP-20.LC (Vilber Lourmat, Франция), термостатируемая водяная баня TW-2.02 (Elmi, Латвия), термостат «Гермит» (ДНК-технология, Россия), шейкер V-3 (Elmi, Латвия). Ультразвуковой гомогенизатор Soniprep 150 (MSE, Великобритания).

2.1.5.2. Программы и интернет-ресурсы

Программы для работы с последовательностями ДНК и белков GeneRunner 3.05 (Hastings Software Inc., США), BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), программа для сохранения изображения DX-CameraControl 1,1b (Kappamesstechnik, Германия), программа MEGA 5 .

База данных нуклеотидных последовательностей NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), база данных FGPR (<http://fungene.cme.msu.edu//index.spr>). Сервисы сравнения нуклеотидных и аминокислотных последовательностей AliBee Multiple Alignment (www.genebee.msu.su/services/malign_reduced.html), Multiple Sequence Alignment CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>).

2.2. Микроорганизмы и их культивирование

2.2.1. Объекты исследования

Работа проводилась с 9 представителями 2 групп бактерий рода *Thiothrix*: представителей группы «*T. nivea*» (*T. nivea* JP2^T DSM 5205, *T.*

lacustris BL^T DSM 21227, *Thiothrix lacustris* AS “UNIQEM” 905, *T. caldifontis* G1^T DSM 21228, *T. caldifontis* G3 “UNIQEM” 981, *T. unzii* A1^T ATCC 49747, *T. unzii* TN “UNIQEM” 959), и группы «Eikelboom type 021N» (*T. flexilis* EJ2M-B^T DSM 14609 и *T. eikelboomii* AP3^T ATCC 49788).

2.2.2. Состав сред и условия культивирования

Для культивирования бактерий использовали среду Амбрустера (Armbruster, 1969) с модификациями. На 1000 мл брали K_2HPO_4 - 21,5 мг, KH_2PO_4 - 8,5 мг, Na_2HPO_4 -34,4 мг, $CaCl_2$ -27,5 мг, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ - 22,5 мг, $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ -0,25 мг. Перед посевом в среду вносили: раствор тиосульфата Na в концентрации – 1 г/л, раствор лактата и ацетата Na – по 300 мг/л, набор витаминов и микроэлементов (Pfennig and Lippert, 1966), pH среды 7,5–7,8. При культивировании *T. lacustris* AS в среду перед посевом вносили NaCl в концентрации 10 г/л. Бактерии культивировали в диапазоне температур 22–27 °С. Для анаэробного культивирования использовались два подхода: а) культивирование в пробирках Хангейта, которые полностью заполняли свежеприготовленной стерильной прокипяченной средой с добавлением 0,5 г/л $NaNO_3$; б) культивирование в пробирках Хангейта, где соотношение среды и газовой фазой составляло 1:1. Газовая фаза была создана путем продувки аргоном (если нитрат акцептор электронов) или закисью азота (если закись азота акцептор электронов). Газы стерилизовали фильтрацией (Millipore, 0,2 мкм). Для анаэробного культивирования для получения биомассы использовали флаконы емкостью 0,5 л с прокладками из полибутиловой резины и завинчивающимися металлическими крышками. Для получения большого объема биомассы с целью дальнейшего выделения и очистки респираторной нитратредуктазы, бактерии культивировали в ферментерах с газовой фазой. При этом ферментеры заполняли средой Амбрустера на треть объема, вносили инокулят, и культивировали микроорганизмы непрерывно продувая среду культивирования атмосферным воздухом для перемешивания и аэрации до достижения необходимой оптической плотности. Оптическую

плотность определяли на спектрофотометре UV-1650 PC (Shimadzu, Япония), при длине волны $\lambda = 600$ нм. По достижении D заданной величины ферментёры продували многократным объёмом азота, после чего бактерии культивировали сутки в микроаэробных условиях.

2.3. Молекулярно-биологические методы

2.3.1. Выделение геномной ДНК

Геномную ДНК штаммов (*T. nivea* JP2^T, *T. lacustris* BL^T, *T. lacustris* AS, *T. caldifontis* G1^T, *T. unzii* A1^T, *T. unzii* TN, *T. eikelboomii* AP3^T, *T. disciformis* B3-1^T, *T. flexilis* EJ2M-B^T) выделяли при помощи набора Genomic DNA Purification Kit (Fermentas) согласно инструкции производителей с модификацией исходной методики. Модификация включает инкубацию образцов с лизоцимом и лизирующим буфером при 85 °С, а также изменение времени (5 мин.) и скоростей центрифугирования (13000 g) на стадиях осаждения, переосаждения геномной ДНК и удаления белков. Эффективность выделения геномной ДНК определяли электрофоретически в 0,8 % агарозном геле. В качестве красителя использовали 1 % бромистый этидий.

2.3.2. ПЦР-амплификация ДНК

ПЦР амплификацию ДНК проводили в смесях для ПЦР с добавлением матрицы ДНК (0,25 мкг/мл) и олигонуклеотидов (5 мкМ каждый), согласно стандартным режимам (табл. 6).

2.3.3. Очистка фрагментов ПЦР с помощью препаративного электрофореза

Очистку ПЦР-фрагментов производили при помощи электрофореза в 0,8 % геле легкоплавкой агарозы в однократном TBE-буфере. В качестве маркера использовали коммерческий набор маркеров HyperLadder IV (Fermentas). Электрофорез проводили при напряжении 140 В, силе тока до 110 мА в течение 20–25 мин. В качестве красителя использовали 1 % бромистый этидий. Выделение и очистку ДНК из геля проводили с использованием

коммерческих наборов DNA Extraction Kit (Fermentas) и Wizard SV Gel и PCR Clean-Up System (Promega) согласно инструкциям производителей. Эффективность выделения, а также концентрацию полученных фрагментов ДНК анализировали электрофоретически.

Таблица 6. Режимы, использованные в ПЦР

№	Наименование гена и тип праймеров	Условия реакции					
		Первичная денатурация	Денатурация	Отжиг праймеров	Элонгация	Число циклов	Конечная элонгация
1	narG 1960 F narG 2659 R	95, 5 мин	95, 30 сек.	60, 30 сек.	72, 30 сек.	35	72, 5 мин
2	narG_Th-F narG_Th-R	95, 5 мин	95, 30 сек.	52, 30 сек.	72, 30 сек.	30	72, 5 мин
3	nirS 1F-E7 nirS 6R-F7	95, 5 мин	95, 30 сек.	60, 30 сек.	72, 30 сек.	35	72, 2 мин
4	nirS_AS-F nirS_AS-R	95, 5 мин	95, 30 сек.	53, 30 сек.	72, 30 сек.	30	72, 2 мин
5	nirK_Th-F nirK_Th-R	95, 5 мин	95, 30 сек.	56, 30 сек.	72, 30 сек.	35	72, 5 мин
6	nrfAF1 nrfA7R1	95, 5 мин	95, 30 сек.	52, 30 сек.	72, 50 сек.	35	72, 3 мин
7	cnorB2FcnorB6R	95, 5 мин	95, 30 сек.	57-52,5 40 сек.	72, 1 мин	40	72, 1 мин
8	qnorB2FqnorB7R	95, 5 мин	95, 30 сек.	57-52,5 40 сек.	72, 1 мин	40	72, 1 мин
9	cnorB ThFcnorB ThR	94, 2 мин	94, 20 сек	54, 30 сек	72, 20 сек	35	72, 2 мин
10	Nos661FNos1773R	95, 5 мин	95, 30 сек.	56, 1,5 мин	72, 2 мин	35	72, 10 мин
11	nosZF nosZR	95, 3 мин	95, 45 сек.	56, 1 мин	72, 2 мин	25	72, 7 мин

Выделение и очистку ДНК проводили с использованием коммерческих наборов DNA Extraction Kit, Wizard SV Gel и PCR Clean-Up System согласно протоколу производителей.

Эффективность выделения, а также концентрацию полученных фрагментов ДНК анализировали электрофоретически.

2.3.4. Выделение суммарной клеточной фракции РНК

Суммарную фракцию клеточной РНК выделяли по методике, описанной ранее Favre-Bonte с соавторами (Favre-Bonte *et al.*, 1999). Клетки осаждались центрифугированием (5мин, 13000 rpm), и были ресуспендированы в 10 мл protoplasting buffer (15 mM Трис-НСl (рН 8,0), 0,45 М сахараза, 8 mM ЭДТА), содержащего 4 мг лизоцима. Протопласты были собраны центрифугированием (5мин, 13000 rpm), ресуспендированы в 0,5 мл лизирующего буфера (10 mM Трис-НСl (рН 8,0), 10 mM NaCl, 1 mM Na-цитрат, 1,5 % SDS), содержащего 15 мкл диэтилпирокарибоната (Sigma), и инкубировались 5 минут при 37 °С. После добавления 250 мкл 5 М NaCl, смесь инкубировалась на льду 10 минут и была центрифугирована (5мин, 13000 rpm). Фракцию клеточной РНК из надосадочной жидкости осаждали внесением 70 % этанола. Осажденная РНК растворялась в 100 мкл воды, обработанной диэтилпирокарибонатом. Концентрация РНК определялась спектрофотометрически при 260 нм, чистота препарата оценивалась по соотношению поглощения при 260 нм к поглощению при 280 нм. Качество полученной РНК контролировали электрофоретически в денатурирующем полиакриламидном геле (4 % ПААГ с 8 М мочевиной).

2.3.5. Получение кДНК-копий (реакция обратной транскрипции) и ОТ-ПЦР

Реакцию обратной транскрипции проводили в соответствии с протоколом фирмы изготовителя (Fermentas, Литва). Смесь РНК (2 мкг) с соответствующим праймером (4 пмоль в деионизованной воде) “плавили” в течение 10 минут при 68 °С, добавляли master mix, содержащий буфер для ревертазы (см. п. 2.1.2.), дНТФ (конечная концентрация в пробе – 0,2 mM) и ингибитор рибонуклеаз. Затем пробирки быстро охлаждали на льду,

добавляли 40 е.а. обратной транскриптазы MMuIV (Revert Aid™) и проводили реакцию при 42 °С в течение 40 мин. Для инактивации фермента, пробы прогревали 5 мин при 85 °С. Последующую ПЦР проводили на приборе ДТ-322. Для амплификации кДНК использовали программу, аналогичную программе для амплификации ДНК, но с уменьшенным до 1 минуты временем начального плавления матрицы. Эксперименты проводили на двух независимых препаратах РНК в трех статистических повторностях.

2.3.6. Определение нуклеотидной последовательности

Определение нуклеотидной последовательности проводили в НИИ Вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН ГУ на автоматическом секвенаторе SEQ2000 XL (“Beckman Coulter”, США) в соответствии с протоколом изготовителя.

2.3.7. Построение филогенетических деревьев

Для построения филогенетических деревьев использовались выровненные в программе ClustalW2 (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) аминокислотные последовательности. В качестве референсных использовались частичные и полные последовательности генов *narG*, *nirS* и *snorB* 150 бактериальных и архейных изолятов, которые были получены из базы данных FGPR. Деревья были построены в программе MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011).

2.4. Химические методы анализа

2.4.1. Анализ анионов

Концентрацию нитрита определяли модифицированным методом Грисса–Илосвая (Уильямс, 1982), с использованием в качестве красителя N-нафтилэтилен-диамин ацетата, концентрацию нитрата – методом титрования хромотроповой кислотой в присутствии H₂SO₄ (Уильямс, 1982) и с помощью нитратомера ИТ-1201 ООО «Измерительная техника» (Россия).

Для определения ионов аммония к 2 мл исследуемого образца приливали 250 мкл реактива Несслера. Оставляли на 10 мин при комнатной температуре, после чего центрифугировали 4 мин при 12000 g для осаждения нерастворимых примесей. Концентрацию ионов аммония определяли на UV-1650 PC (Shimadzu, Япония) в надосадочной жидкости при длине волны 400 нм (Milner and Miller, 1948).

Молекулярный азот определяли на газовом хроматографе «Хроматек Кристалл 5000.1» (Россия).

Сероводород определяли методом иодометрического титрования (Резников и др., 1970). Концентрацию растворенного кислорода в среде определяли с помощью кислородомера Hi 9142 (Румыния)

2.5. Методы определения активности ферментов

2.5.1. Определение активности нитратредуктазы

2.5.1.1. Получение бесклеточного экстракта

Для получения бесклеточных экстрактов клетки отбирали в поздней логарифмической фазе роста, центрифугировали в течение 20 мин при 15000 g и 4 °C, супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в буфере А (рабочий буфер). Осадок либо замораживали при - 70 °C для последующей экстракции, либо немедленно подвергали ультразвуковой дезинтеграции.

Клетки разрушали ультразвуком с помощью дезинтегратора Soniprep 150 с частотой 22 КГц и мощностью 40 Ватт путем озвучивания суспензии на ледяной бане 5 раз по 1 мин с перерывами в 1 минуту. Полученный гомогенат центрифугировали (30000 g, 30 мин, 4 °C). Надосадочную жидкость пропускали через мембранные фильтры Whatman GD/X (Whatman, США) с диаметром пор 0,2 мкм и хранили на ледяной бане.

2.5.1.2. Определение активности нитратредуктазы

Для определения активности нитратредуктазы использовали реакционную смесь Б. В 800 мкл смеси Б вносили 5 мкл пробы. Реакцию инициировали внесением в реакционную среду 100 мкл 0,1 М дитионита натрия. Продолжительность экспозиции – 10 мин. Об активности фермента судили по концентрации образовавшихся нитритов (пункт 2.4.1.).

2.6. Очистка и характеристика респираторной нитратредуктазы

2.6.1. Очистка фермента

Для выделения респираторной нитратредуктазы *T.lacustris* AS культивировался в среде Амбрустера, содержащей 500 мг/л нитрата натрия во флаконах объемом 250 мл, при 22 °С без перемешивания и аэрации. Использовали культуры, достигшие поздней логарифмической фазы роста, время роста 72 ч.

Очистку респираторной нитратредуктазы из бесклеточного экстракта *Thiothrix lacustris* AS проводили в соответствии со следующей схемой:

Стадия 1. Гель-фильтрация на колонке HiLoad 26/60 Superdex 200 (GEHealthcare). Препарат фильтровали с использованием фильтров Whatman GD/X (диаметр пор 0,2 мкм) и наносили на колонку, предварительно уравновешенную буфером А. В качестве элюэнта использовался этот же буфер. Скорость потока 1 мл/мин. Детектирование поглощения осуществляли при $\lambda=280$ нм. Активные фракции объединялись и использовались для дальнейшей очистки.

Стадия 2. Анионообменная хроматография. Далее препарат белка наносили на колонку Mono Q HR 16/10 (GE Healthcare, США), предварительно уравновешенную буфером А без NaCl. Затем через колонку пропускали четырехкратный объем буфера А без NaCl для удаления несвязавшихся с неподвижной фазой колонки компонентов. Вещества

элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl (150 – 350 мМ) за 20 минут, измерения проводили при $\lambda=280$ нм.

Стадия 3. Препаративный электрофорез в полиакриламидном геле с градиентом концентрации 4-10 % в системе для кислых белков: 4-10 % акриламид-метиленабисакриламид; 0,375 М Трис-HCl pH 8,8; 0,025 % ТЕМЕД; 0,025 % персульфат аммония. Режим электрофореза: 120 В, 45 мА, 30 Вт, стабилизация по току. Локализацию нитратредуктазы в пластинке геля определяли, проведя специфическое окрашивание: пластинку геля выдерживали в реакционной смеси Б 7 – 15 мин при 60 °С до появления бесцветной полосы на синем фоне. Участок геля, содержащий фермент, вырезали, измельчали механически, смешивали с 50 мл буфера А и экспонировали 18 часов при 4 °С для перехода белка в раствор.

Стадия 4. Повторная анионообменная хроматография. Раствор белка в буфере А после препаративного электрофореза был повторно нанесён на колонку *monoQ*, предварительно уравновешенную тем же буфером. Фермент элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl 0 – 1 М за 10 минут, измерения проводили при $\lambda=280$ нм. При этом был получен гомогенный препарат белка в концентрации, достаточной для изучения физико-химических и кинетических свойств.

2.6.2. Определение молекулярной массы нативного препарата респираторной нитратредуктазы

Молекулярную массу нативного фермента определяли по результатам нативного электрофореза в полиакриламидном геле с использованием набора маркеров набор High Molecular Weight Native Marker Kit (GE Healthcare), содержащий тироглобулин (669 кДа), ферритин (440 кДа), каталазу (232 кДа), лактатдегидрогеназу (140 кДа) и БСА (66 кДа). Белковые полосы проявляли по Fairbanks (1971) с модификациями. Окрашивание проводили с помощью красителя Serva Blue R, инкубируя гель в водном растворе, содержавшем 0,05 % красителя, 25 % изопропанола, 10 % уксусной кислоты

на кипящей водяной бане в течение 1 час. Фон отмывали 200 мл 10 % уксусной кислоты на водяной бане.

Специфическое окрашивание на нитратредуктазную активность осуществляли путем инкубирования пластины геля с исследуемым белком в реакционной смеси Б (пункт 2.1.2.).

2.6.3. Определение молекулярной массы субъединиц

Для определения субъединичного состава респираторной нитратредуктазы и массы отдельных субъединиц использовали денатурирующий диск-электрофорез в полиакриламидном геле. Электрофорез проводили по методу Laemmli (1970) с 0,1% SDS в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ) с помощью аппарата Mini-Protean (Bio-Rad, США) и источника тока ECPS 3000/150 (Pharmacia, Швеция). Состав концентрирующего геля: 4 % акриламид-метиленбисакриламид; 0,125 М Трис-НСl pH 6,8; 0,1 % SDS; 0,025 % ТЕМЕД; 0,025 % персульфат аммония. Состав разделяющего геля: 10 % акриламид-метиленбисакриламид; 0,375 М Трис-НСl pH 8,8; 0,2 % SDS; 0,025 % ТЕМЕД, 0,025 % персульфат аммония. Состав электродного буфера (pH 8,3): 0,025 М Трис; 0,0192 глицин; 0,1 % SDS. Состав буфера для образцов: 0,0625 М Трис-НСl pH 6,8; 2 % SDS; 10 % глицерин; 5 % β -меркаптоэтанол; 0,001 % бромфеноловый синий.

Режим электрофореза: 120 В, 30 мА, 30 Вт, стабилизация по току.

Пробы, содержавшие белок, перед нанесением смешивали с двумя объемами буфера для образцов и кипятили на водяной бане в течение 10 мин. Окрашивание белков проводили нитратом серебра по следующей методике: Гель фиксировали раствором 50 % трихлоруксусной кислоты и 50 % ацетона в соотношении 1:1, содержавшим 0,065 % формальдегида, в течение 20 мин. Фиксирующую смесь отмывали деионизованной водой. Затем гель помещали в 50 % раствор ацетона на 10 мин, ацетон удаляли, а гель обрабатывали свежеприготовленным 0,02 % тиосульфатом натрия в течение 1 мин. Гель отмывали деионизованной водой и обрабатывали 0,2 % раствором нитрата

серебра, содержащим 0,4 % формальдегида в течение 10 мин в темноте, после чего вновь отмывали деионизованной водой. Белковые полосы проявляли, инкубируя гель в 0,01 % свежеприготовленном растворе тиосульфата натрия, содержащем 2 % карбоната натрия в течение 3 мин в темноте. Окраска закреплялась инкубацией в 7 % уксусной кислоте в течение 5 мин.

Молекулярная масса денатурированного белка определялась с помощью наборов Low Molecular Weight SDS Marker Kit (GE Healthcare), содержавшего фосфоорилазу В (97 кДа), бычий сывороточный альбумин (БСА) (66 кДа), овальбумин (45 кДа), карбоангидразу (30 кДа), ингибитор трипсина (20 кДа), α -лактоальбумин (14,4 кДа) и High Molecular Weight SDS Marker Kit (GE Healthcare), содержавшего миозин (220 кДа), α -2-макроглобулин (170 кДа), β -галактозидазу (116 кДа), трансферрин (76 кДа), БСА (66 кДа) и глутаматдегидрогеназу (53 кДа). Молекулярную массу белков рассчитывали по калибровочной кривой, выражавшей зависимость между логарифмом молекулярной массы и относительной электрофоретической подвижностью (R_f) белков-стандартов.

2.6.4. Определение оптимума pH, температурного оптимума и термостабильности

Температурный оптимум определяли с использованием реакционной смеси Б с метилвиологеном в качестве донора электронов для нитратредуктазы. Продолжительность экспозиции – 10 мин. Об активности фермента судили по концентрации образовавшихся нитритов. Для определения оптимума использовали серию опытов с диапазоном температур реакционной среды от 5 °С до 100 °С.

pH оптимум определяли в реакционной смеси Б со значениями pH от 6,0 до 10,0 с шагом в 1,0. Продолжительность экспозиции 10 мин при температуре реакционной смеси 60 °С.

Для определения термостабильности фермент экспонировали на водяной бане при температуре 50 °С и 60 °С до потери активности на 75 – 85

% от начальной величины. При этом каждые 5 минут (в среднем) отбирали пробы для определения активности. Активность нитратредуктазы определяли в реакционной смеси Б в стандартных условиях (пункт 2.5.1.2.)

2.6.5. Определение кинетических свойств нитратредуктазы NarGHI

Значения K_m и V_{max} определяли с помощью графика зависимости активности фермента от концентрации субстрата. Расчеты проводили в двойных обратных координатах ($1/V$ и $1/[S]$) по графику Лайнувера-Берка (Диксон и Уэбб, 1982; Лакин, 1990). Измерения проводили спектрофотометрически как описано в п. 2.5.1.2.

2.7. Определение концентрации белка

Концентрация белка была определена по методу Braadford в соответствии с рекомендациями производителя, а также по методу Лоури (Lowry *et al.* 1951). В качестве стандарта использовали BSA.

2.8. Статистическая обработка результатов

Все эксперименты проводили не менее чем в трех повторностях, по результатам которых вычисляли среднее значение. На основании полученных выборок определяли стандартное отклонение и вычисляли доверительный интервал при уровне значимости 0,95.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Биохимия нитратного дыхания у представителей серобактерий рода

Thiothrix

3.1.1. Анаэробный рост и динамика восстановления нитратов и образования нитритов при анаэробном дыхании на нитратах

Способность к анаэробному дыханию была проверена у представителей двух групп *Thiothrix*: представителей группы “*T. nivea*” (*T. lacustris* BL^T DSM21227, *T. lacustris* AS “UNIQEM” 905, *T. caldifontis* G1^T, *T. caldifontis* G3 “UNIQEM” 981, *T. unzii*A1^T, *T. unzii* TN “UNIQEM” 959) и группы “Eikelboom type 021N” (*T. eikelboomii* AP3^T). В качестве контроля использовали штаммы, для которых ранее был получен геномный сиквенс *T. nivea* JP2^T (Lapidus *et al.*, 2011), *T. flexilis* EJ2M-B^T (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/14260>) и *T. disciformis* B3-1^T (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/14257>).

Все исследованные штаммы в присутствии доноров электронов: органического субстрата (лактат + ацетат) и тиосульфата (миксотрофный рост) были способны к росту в анаэробных условиях в присутствии нитратов в качестве терминального акцептора электронов. Бактерии культивировали во флаконах без газовой фазы - флаконы заполняли доверху свежепрокипяченной стерильной средой Амбрустера с добавлением NaNO₃ из расчета 0,5 г/л.

Максимальный прирост белка составил для разных штаммов от 10,6 до 15,0 мг белка/л и был отмечен через 72 ч.

В отсутствии нитратов, но в присутствии органического субстрата и тиосульфата, роста бактерий в анаэробных условиях не происходило. Анаэробный рост у данных микроорганизмов сопровождался убылью нитратов в среде культивирования и накоплением нитритов, концентрация которых составила 81-85 % от восстановленных нитратов (табл. 7, рис. 23).

Таблица 7. Соотношение убыли тиосульфата, роста нитритов и количества белка при аэробном (1) и анаэробном (2) росте у представителей рода *Thiothrix*

Бактерии	Максимальный прирост белка, мг/л		Окислено $S_2O_3^{2-}$, мМ		Увеличение удельной скорости окисления $S_2O_3^{2-}$, мМ/мг белка, %	Восстановлено NO_3^- , мМ	Образовано NO_2^- , мМ
	1	2	1	2			
<i>T. lacustris</i> BL ¹	29,9	15,0	2,02	2,41	235	0,38	0,31
<i>T. lacustris</i> AS	25,8	13,2	2,48	2,84	229	1,54	1,30
<i>T. caldifontis</i> G1 ¹	20,1	12,5	1,89	2,23	191	0,70	0,58
<i>T. unzii</i> A1 ¹	17,8	10,6	1,65	1,92	194	0,60	0,50
<i>T. eikelboomii</i> AP3 ¹	22,6	13,1	1,53	2,48	279	0,58	0,49

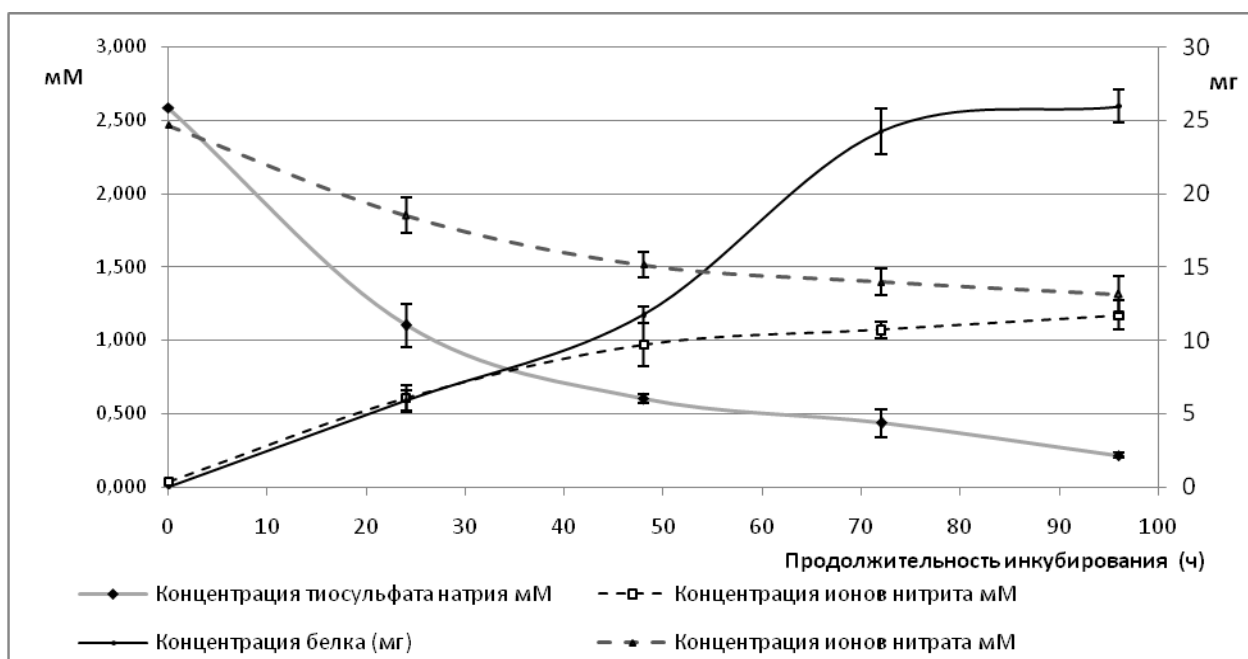


Рис. 23. Динамика окисления тиосульфата, восстановления нитрата, накопления нитрита и прироста белка при анаэробном культивировании *T. lacustris* AS.

Накопления ионов аммония в среде культивирования обнаружить не удалось. Вероятно часть нитратов (15 – 19 %) расходовалась на ассимиляционные нужды клетки. При накоплении в среде выше 0,3–1,3 мМ

нитритов у различных штаммов было отмечено их ингибирующее влияние на бактериальный рост, процессы восстановления нитратов и окисление тиосульфата.

3.1.2. Определение активности диссимиляционной нитратредуктазы

Для того чтобы убедиться в способности представителей рода *Thiothrix* к диссимиляционному восстановлению нитратов и ферментативному образованию нитритов, была определена суммарная активность нитратредуктаз в аэробных и анаэробных условиях роста (табл. 2). При аэробном росте активность нитратредуктазы у разных штаммов не превышала величин 3,91–11,08 нмоль·мин⁻¹·мг белка⁻¹. При анаэробном росте активность фермента возрастала до 21,08–43,47 нмоль·мин⁻¹·мг белка⁻¹, т.е. суммарная активность нитратредуктаз была в 5 раз выше (табл. 8).

Таблица 8. Активность нитратредуктазы у представителей рода *Thiothrix* при аэробном и анаэробном росте

Бактерии	Активность нитратредуктазы (нмоль·мин ⁻¹ ·мг белка ⁻¹)	
	Аэробные условия роста	Анаэробные условия роста
<i>T. lacustris</i> BL ^T	9,94	34,47
<i>T. lacustris</i> AS	11,08	39,13
<i>T. caldifontis</i> G1 ^T	6,03	28,98
<i>T. unzii</i> A1 ^T	3,91	21,08
<i>T. eikelboomii</i> AP3 ^T	10,78	43,47

Известно, что при аэробном росте в клетках бактерий могут функционировать два типа нитратредуктаз. Это ассимиляционная цитоплазматическая нитратредуктаза и периплазматическая нитратредуктаза (например, NapAB, принимающая участие в поддержании гомеостаза при переходе клетки от аэробного к анаэробному метаболизму). Можно предположить, что у исследованных штаммов в анаэробных условиях столь существенное увеличение суммарной активности нитратредуктаз происходит за счет синтеза респираторной нитратредуктазы. Вышесказанное

подтверждает факт снижения интенсивности ассимиляционных процессов в клетке и увеличение удельной скорости окисления донора электронов – тиосульфата в анаэробных условиях по сравнению с аэробными. Прирост белка в анаэробных условиях почти в 2 раза ниже по сравнению с аэробными, а скорость окисления тиосульфата в расчете на 1 мг белка в 2–2,7 раза выше (табл. 1). Полученные выше результаты свидетельствуют о том, что в анаэробных условиях индуцируется активность нитратредуктазы, которая связана с нитратным дыханием, сопряженным с окислением тиосульфата.

3.1.3. Очистка и характеристика респираторной нитратредуктазы

T. lacustris AS

3.1.3.1. Очистка респираторной нитратредуктазы NarGHI

Разработанная схема очистки мембраносвязанной нитратредуктазы включала следующую последовательность из 5 этапов: ультразвуковую дезинтеграцию биомассы, гель-фильтрацию на колонке HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare), анионообменную хроматографию на колонке Mono Q HR 16/10 (GE Healthcare), препаративный электрофорез в градиентном полиакриламидном геле. В качестве конечной стадии очистки повторно использовали анионообменную хроматографию на колонке Mono Q HR 16/10 в широком градиенте NaCl, что позволило дополнительно сконцентрировать препарат белка для дальнейших исследований. Обобщенная схема очистки нитрат редуктазы представлена на рис. 24.

Предварительные исследования термостабильности белка показали возможность использования препаративного электрофореза и колоночной хроматографии при температуре 20-22 °С. Стадию экстракции этанолом и другими органическими растворителями не использовали для очистки по причине необратимой потери 60 - 75 % активности фермента.

Белок был очищен с низким выходом (табл. 9), что связано с особенностями применяемых методов очистки.

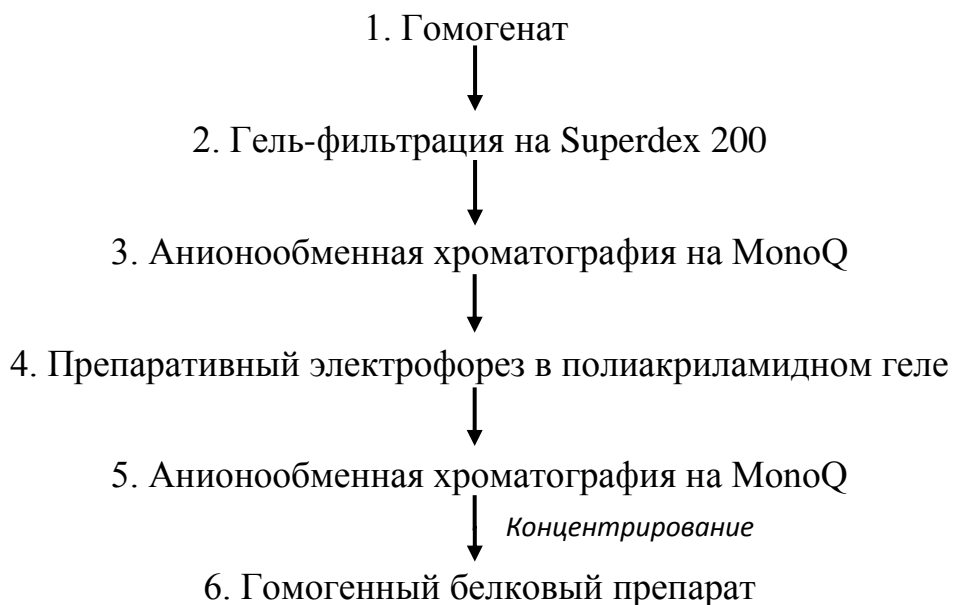


Рис. 24. Схема очистки респираторной нитратредуктазы

Таблица 9. Таблица очистки респираторной нитратредуктазы

Стадия очистки	Общий объём (мл)	Белок, мг	Общая активность (Е)	Удельная активность (Е/мг)	Выход %	Степень очистки
Гомогенат	18	626,4	780,84	1,24	100	1
Гель-фильтрация на Superdex 200	29	200,1	538,82	2,69	69	2,2
Анионообменная хроматография на MonoQ (0,15 – 0,45M NaCl)	3	25,2	195,78	7,76	25	6,3
Препаративный электрофорез в ПААГ	21	2,1	86,94	41,4	11	33,4
Анионообменная хроматография на MonoQ (0 – 1M NaCl)	1,5	0,36	35,19	97,75	4,5	78,8

В частности, применение препаративного электрофореза в полиакриламидном геле чревато потерей активности по причине разогрева пластины геля на протяжении всего процесса электрофореза. Для постановки

электрофореза использовалась специальная камера, толщина геля составляла 4 мм. Охлаждение до 4 °С не применялось во избежание деформаций пластины геля.

3.1.3.2. Молекулярные свойства мембраносвязанной нитратредуктазы

По данным денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле показано, что очищенная нитратредуктаза NarGH представляет собой гетеродимер с молекулярной массой субъединиц NarG – около 100 кДа и NarH – около 80 кДа (рис. 25, А).

Молекулярная масса очищенного препарата фермента, определенная с помощью нативного электрофореза была равной 170 кДа (рис. 25, Б)

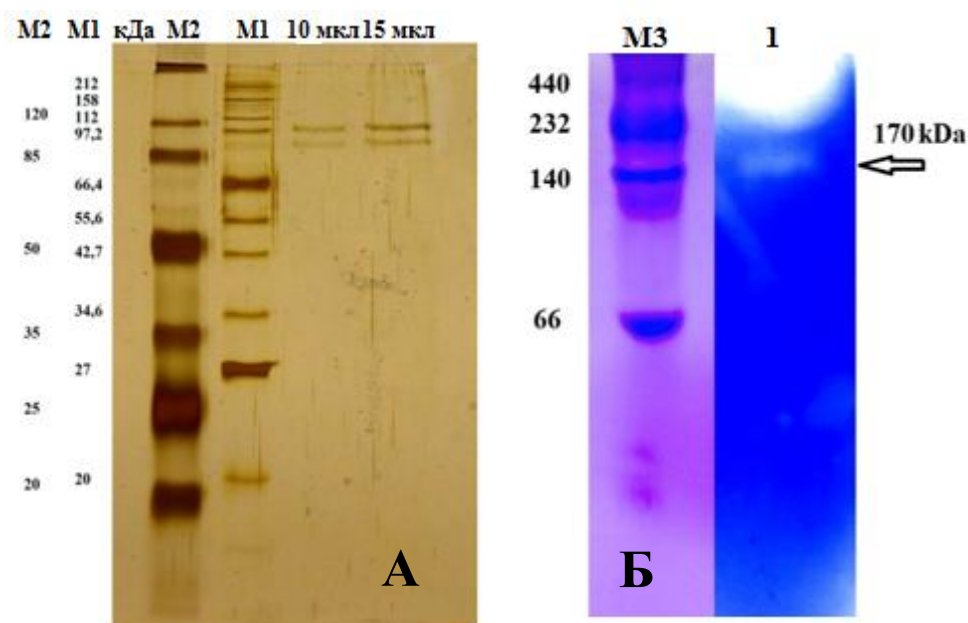


Рис. 25. ПААГ-электрофорез очищенного препарата нитратредуктазы.

А – денатурирующий электрофорез в 10 % ПААГ; М1 – Белки-маркеры: Protein Marker, Broad Range (New England Biolabs), М2 – Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas); Окрашивание нитратом серебра. Б – нативный электрофорез в ПААГ с градиентом концентрации 4-10 %; М3 – Белки-маркеры: High Molecular Weight Native Marker Kit (GE Healthcare); окрашивание проводили с помощью красителя Serva Blue R. 1– очищенный препарат нитратредуктазы; специфическое окрашивание препарата нитратредуктазы на активность.

3.1.3.3. Физико-химические свойства респираторной нитратредуктазы

Влияние рН. Исследование зависимости скорости окисления доноров электронов, таких как метилвиологен, бензилвиологен и бромфеноловый синий (для восстановления донора электронов использовали дитионит натрия) от рН среды показало, что оптимальное значение рН для работы нитратредуктазы – 7,2 – 7,3, 6,0 – 6,2 и 8,4 – 8,6, соответственно (рис. 26). Фермент обладал относительно широким диапазоном значений рН, в котором наблюдалась активность, и быстро терял активность при защелачивании среды.

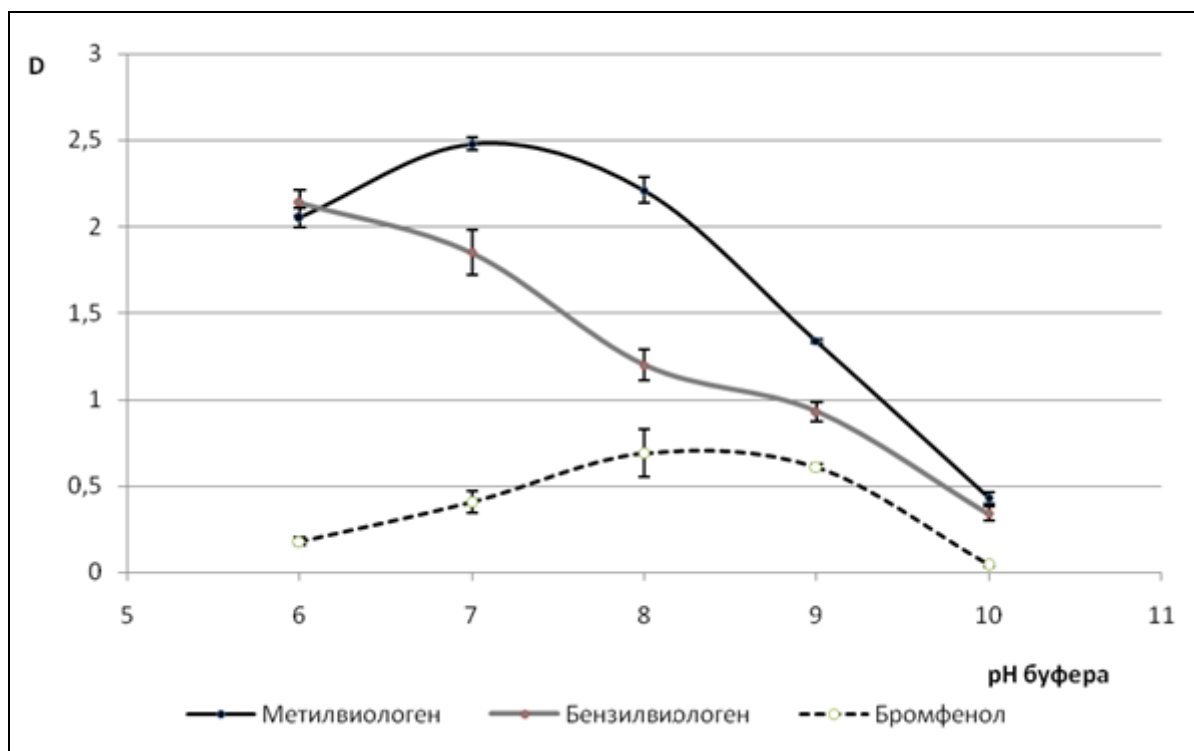


Рис. 26. Зависимость активности нитратредуктазы от рН среды.

Влияние температуры. Изучение влияния температуры на активность нитратредуктазы показало, что температурный оптимум фермента лежал в пределах от 63 °С до 65 °С (рис. 27), при повышении температуры вплоть до 100 °С активность фермента падала. При этом в температурных границах от 5 °С до 25 °С, в которых живёт *T. lacustris* AS активность нитратредуктазы составила менее 2 % от максимального значения.

Исследование термостабильности фермента показало следующее: при инкубировании нитратредуктазы при 50 °С фермент терял 50 % своей начальной активности за 2 часа. При повышении температуры на десять градусов (до 60 °С) происходило снижение активности до 30 % от начального уровня в течение 1 часа экспозиции (рис. 28).

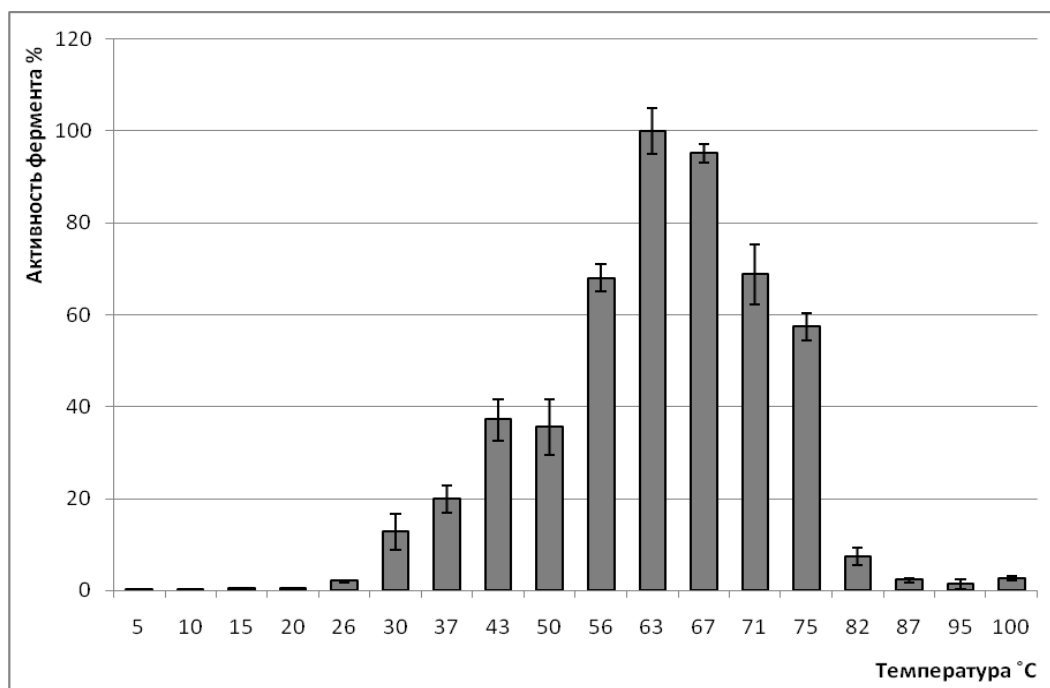


Рис. 27. Температурный оптимум респираторной нитратредуктазы.

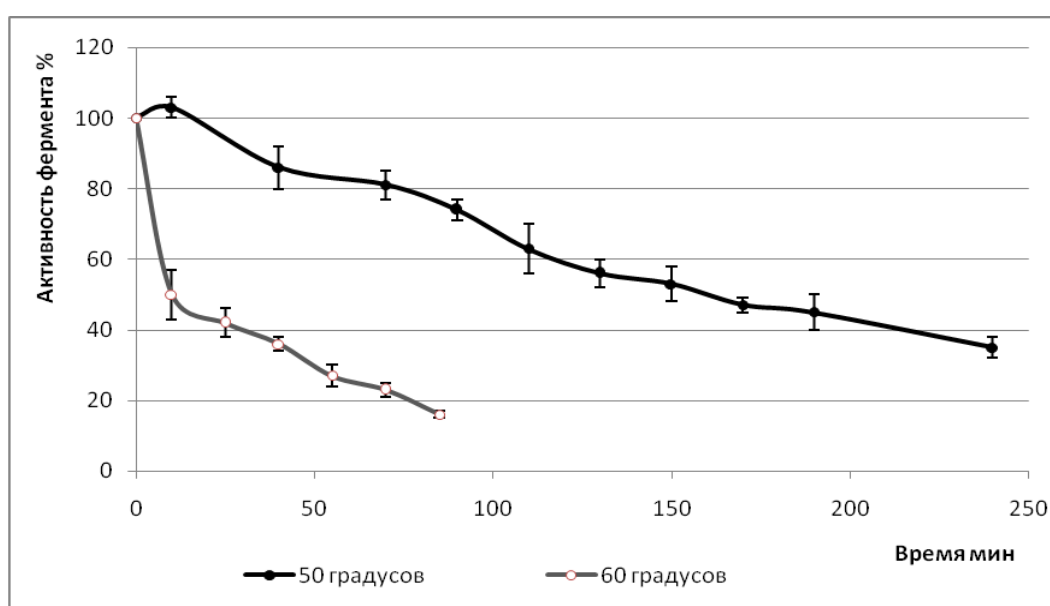


Рис. 28. Термостабильность респираторной нитратредуктазы.

3.1.3.4. Кинетические и регуляторные свойства мембраносвязаной нитратредуктазы

Кинетические характеристики фермента были определены с использованием нитрата натрия в качестве субстрата в стандартной реакционной смеси (смесь 1) при температуре реакционной смеси 60 °С. Величина K_m по нитрату составила 0,234 мМ; V_{max} – 0,945 Е/мг белка, V_{max}/K_m – 4,03 (рис. 29).

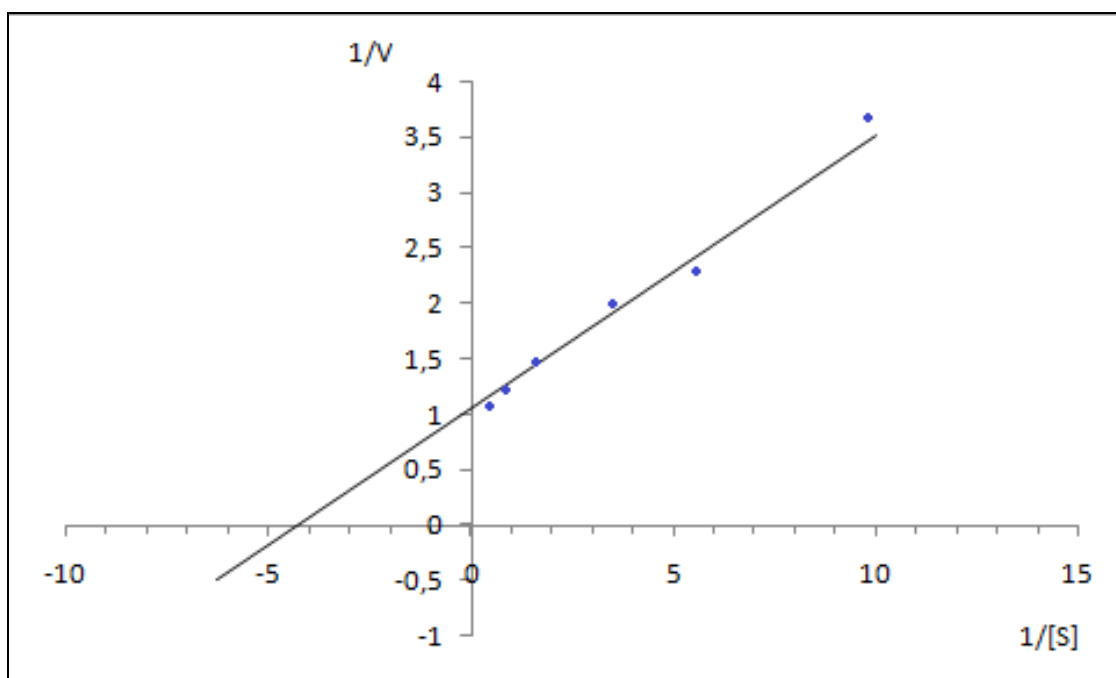


Рис. 29. Значение константы Михаэлиса для респираторной нитратредуктазы по нитрату: $K_m = 0,234$ мМ.

Ингибиторный анализ. Бета-меркаптоэтанол и азид натрия уже в концентрации 10-50 мМ существенно ингибировали нитратредуктазу, в то время как ЭДТА, диэтилдитиокарбамид натрия и фенантролин оказывали слабый ингибирующий эффект на активность фермента (рис. 30, 31).

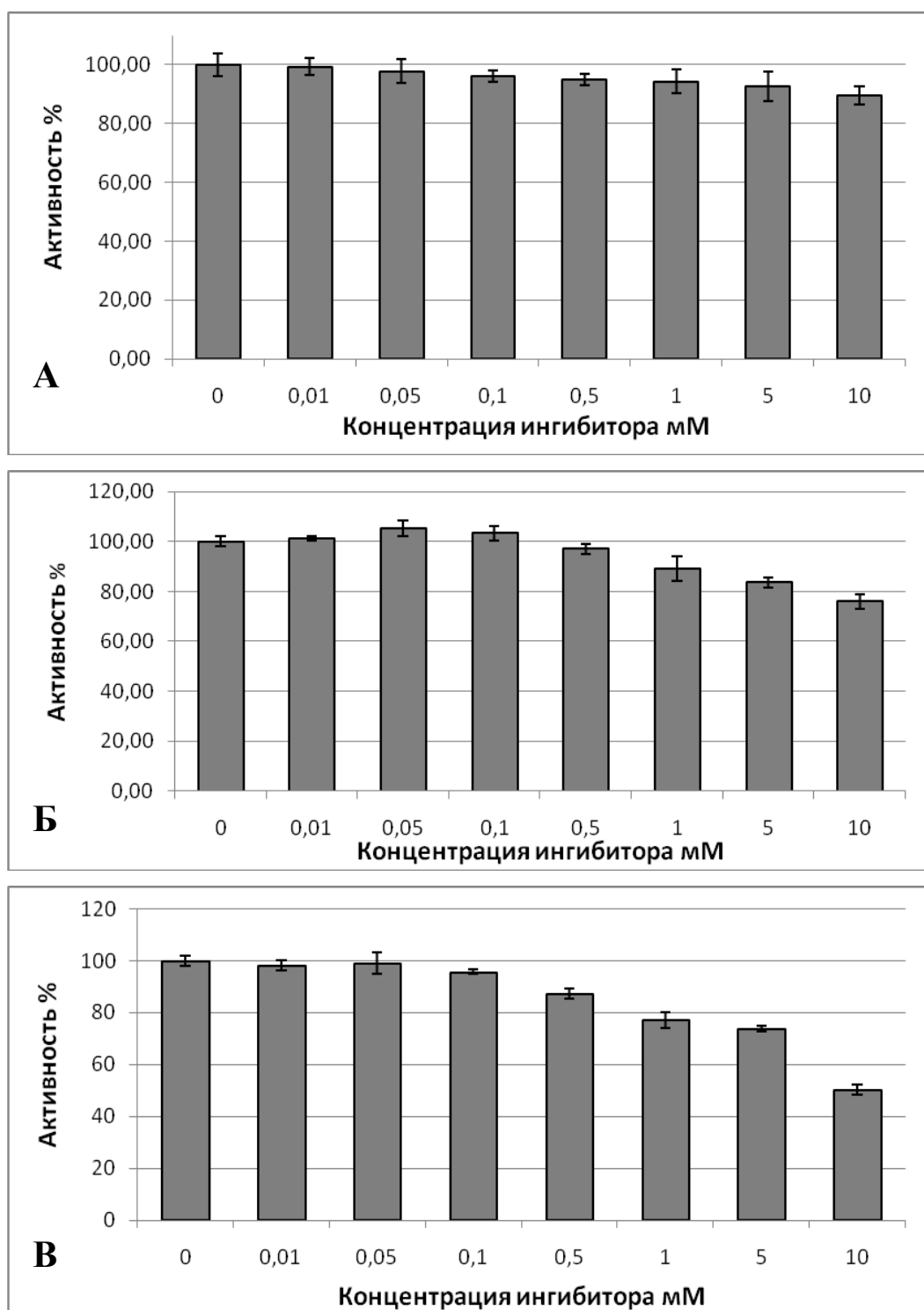


Рис.30. Влияние ингибиторов на активность нитратредуктазы: А – фенантролин, Б – ЭДТА, В - диэтилдитиокарбамид натрия.

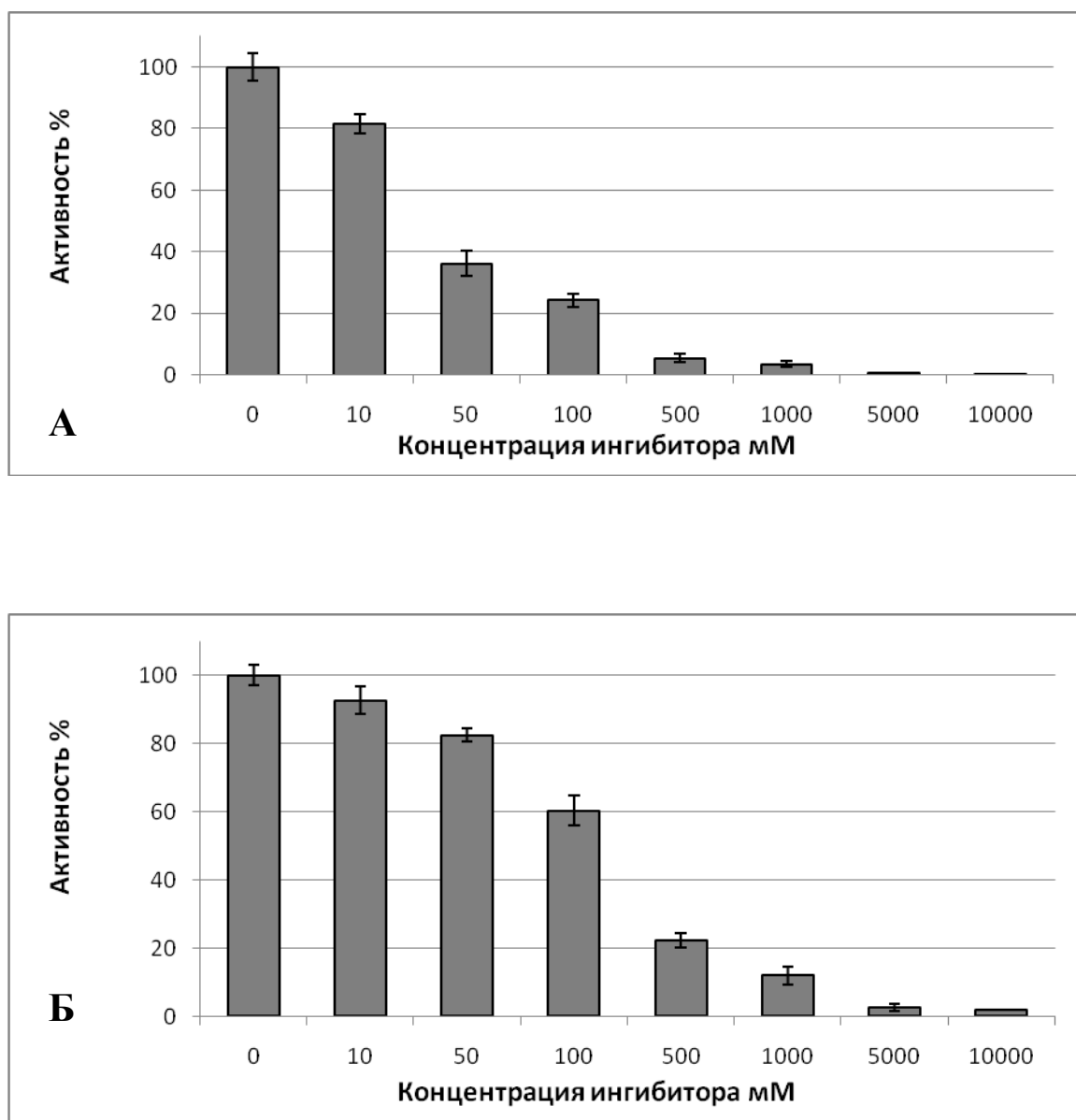


Рис. 31. Влияние ингибиторов (А - азид натрия, Б - бета-меркаптоэтанол) на активность респираторной нитратредуктазы, выраженное через зависимость оптической плотности реакционной смеси от концентрации ингибитора.

3.1.3.5. Детекция гена *narG*, кодирующего респираторную нитратредуктазу

Для подтверждения наличия нитратного дыхания, в результате которого нитраты восстанавливаются до нитритов при участии нитратредуктазы NarGHI (Zumft, 1997), была проведена идентификация гена *narG* у представителей рода *Thiothrix*. Была выделена геномная ДНК из штаммов, указанных выше (см. п. 3.1.1.). Проведена ПЦР с использованием пары вырожденных праймеров, специфичных к гену *narG* (*narG*1960

F/*narG2659R*). У всех исследованных штаммов *Thiothrix* были выявлены ампликоны ожидаемой величины – около 650 п.н. (рис. 32).

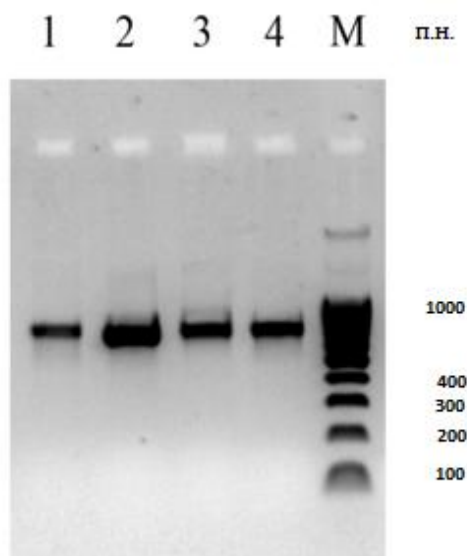


Рис. 32. Электрофорез в агарозном геле (1,2 %) продуктов ПЦР-амплификации, полученных с праймерами к гену *narG* (*narG1960* F/*narG2659R*).

1 – *T. caldifontis* G1^T, 2 – *T. lacustris* BL^T, 3 – *T. eikelboomii* AP3^T, 4 – *T. unzii* A1^T. М – маркеры ДНК Hyper Ladder IV. Справа указана величина соответствующих полос маркера (от 100 до 1000 п.о.).

Были определены нуклеотидные последовательности ПЦР-продуктов, которые были помещены в GenBank под номерами JX267821 (*T. caldifontis* G1^T), KF926097 (*T. caldifontis* G3), JX267822 (*T. eikelboomii* AP3^T), JX267823 (*T. unzii* A1^T), JX267824 (*T. lacustris* BL^T), JX267825 (*T. lacustris* AS).

Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностями, имеющимися в базе данных NCBI, показало, что они имеют высокую степень гомологии с фрагментами гена *narG*, кодирующего альфа-субъединицу мембраносвязанной респираторной нитратредуктазы из *Halomonas halodenitrificans* IFO 14912 (номер в GenBank AB076402.2). Степень гомологии составила 75,5–76,3 % (табл. 10).

Таблица 10. Процент сходства полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностью гена *narG* из штамма *Halomonas halodenitrificans* IFO 14912.

Виды / штаммы	AS	BL ^T	A1 ^T	AP3 ^T	G1 ^T	G3	TN	IFO 14912
<i>T. lacustris</i> AS	100 %							
<i>T. lacustris</i> BL ^T	98 %	100 %						
<i>T. unzii</i> A1 ^T	85 %	84 %	100 %					
<i>T. eikelboomii</i> AP3 ^T	83 %	83 %	96 %	100 %				
<i>T. caldifontis</i> G1 ^T	83 %	83 %	95 %	95 %	100 %			
<i>T. caldifontis</i> G3	82 %	82 %	93 %	94 %	93 %	100 %		
<i>T. unzii</i> strain TN	84 %	83 %	94 %	93 %	94 %	91 %	100 %	
<i>Halomonas halodenitrificans</i> IFO 14912	78 %	77 %	77 %	76 %	76 %	76 %	76 %	100 %

На базе полученных с вырожденными праймерами последовательностей гена *narG* у представителей рода *Thiothrix* (*T. lacustris* BL^T, *T. lacustris* AS, *T. caldifontis* G1^T, *T. unzii* A1^T, *T. eikelboomii* AP3^T) нами были разработаны специфичные праймеры. Для подбора специфичных праймеров полученные нуклеотидные последовательности гена *narG* были выровнены с использованием программы Alibee – Multiple Alignment (http://www.genebee.msu.ru/services/malign_reduced.html). Далее были идентифицированы консервативные участки, имеющиеся во всех выровненных последовательностях (рис.33).

К данным участкам были подобраны специфичные праймеры, позволяющие амплифицировать фрагмент гена *narG* величиной 298 пар нуклеотидов: *narG_Th-F* и *narG_Th-R*. Со специфичными праймерами была проведена ПЦР (рис. 34).

Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *narG*, полученных с использованием специфичных праймеров, подтвердило результаты, полученные с вырожденными праймерами. Более того, ген *narG* был обнаружен у *T. unzii* TN и отсутствовал у *Thiothrix nivea* JP2^T и *T. disciformis* B3-1^T. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена *narG* *T. unzii* TN была депонирована в GenBank под номером KF039721.

3.1.3.6. Экспрессия гена *narG*

Для одного из штаммов, *T. lacustris* AS, была очищена тотальная РНК и с помощью обратной транскрипции со специфичным для гена *narG* праймером была получена кДНК. При проведении ОТ-ПЦР в пробах, содержащих кДНК, полученную из мРНК культуры, растущей в анаэробных условиях, наблюдался синтез ампликонов, а в пробах, соответствующих аэробному росту, синтеза ампликона ожидаемого размера не наблюдалось или же он был очень слабым (рис. 35).

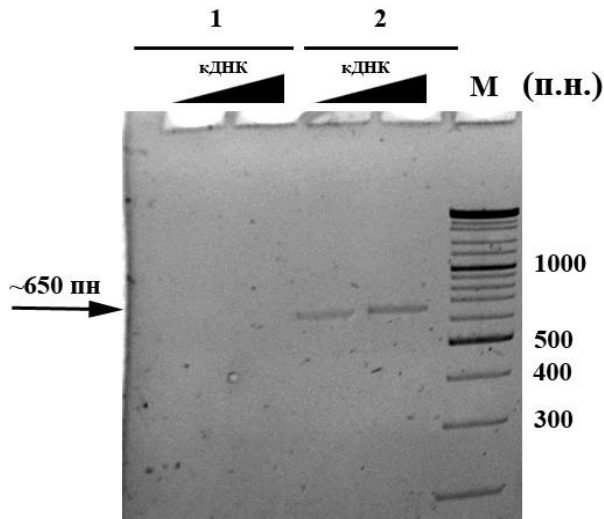


Рис. 35. Анализ уровня экспрессии гена *narG* у штамма *T. lacustris* AS при культивировании в анаэробных условиях относительно аэробных.

1 – аэробные условия культивирования, 2 – анаэробные условия культивирования, треугольниками показано увеличение концентрации кДНК в пробе (2 мкл, 4 мкл). М – маркеры ДНК FastRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

Таким образом, показано, что при анаэробном культивировании в клетке присутствует большое количество мРНК гена *narG*, тогда как при росте в аэробных условиях экспрессии гена *narG* не было выявлено.

Наличие гена *narG* у всех изучаемых организмов, его относительно высокий уровень экспрессии при анаэробном культивировании у *T. lacustris* AS, способность к анаэробному росту в присутствии нитрата, а также накопление нитрита в среде культивирования позволяет предположить, что ген *narG* экспрессируется и у других исследованных представителей рода *Thiothrix* при анаэробном росте.

Для подтверждения этой гипотезы для представителей *T. lacustris* BL^T, *T. caldifontis* G1^T, *T. unzii* A1^T, TN и *T. eikelboomii* AP3^T, была также очищена тотальная РНК, получена кДНК и проведена ОТ-ПЦР. При проведении ОТ-ПЦР в пробах, содержащих кДНК, полученную из мРНК культуры, растущей в анаэробных условиях, наблюдался интенсивный синтез ампликонов, превышающий таковой в пробах, соответствующих аэробному росту, в 2,37 – 6,51 раза.

Следует отметить, что транскрипция гена *narG* была существенно выше при росте культуры в анаэробных условиях (синтез начинался на 26-27 циклах), тогда как при аэробном росте она была очень низкой (продукт детектировался только на 39-40 цикле реакции). Наиболее интенсивная экспрессия была характерна для *T. unzii* TN и *T. eikelboomii* AP3^T (рис. 36).

Все это подтверждает наличие нитратного дыхания у изучаемых представителей рода *Thiothrix* с участием респираторной нитратредуктазы (NarGHI).

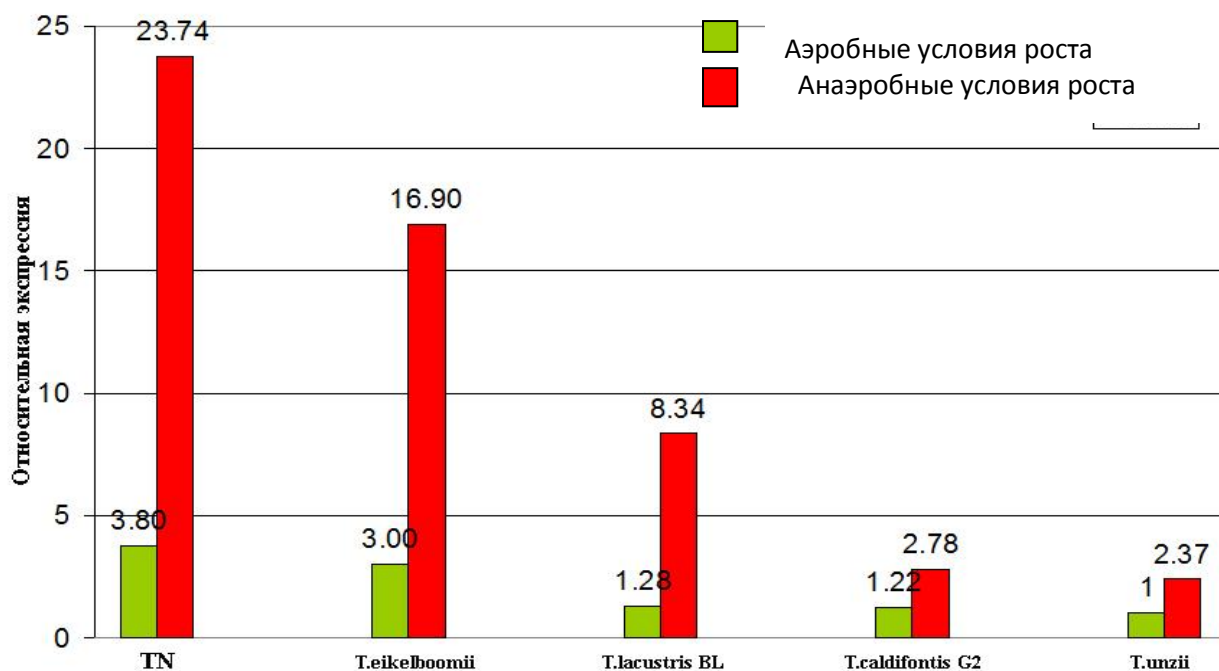


Рис. 36. Динамика экспрессии гена *narG* различных штаммов *Thiothrix* в аэробных и анаэробных условиях культивирования:

1 – *T. unzii* TN, 2 – *T. eikelboomii* AP3^T, 3 *T. lacustris* BL^T, 4 – *T.caldifontis* G1^T, 5 – *T. unzii* A1^T.

3.1.3.7. Филогенетический анализ последовательностей гена *narG*

В результате проведения филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей гена *narG* нитчатых бактерий рода *Thiothrix* было построено филогенетическое дерево: последовательность гена *narG* штаммов рода *Thiothrix* тесно сгруппированы и являются частью филогенетического кластера, объединяющего большинство представителей класса *Gamma*proteobacteria (рис. 37).

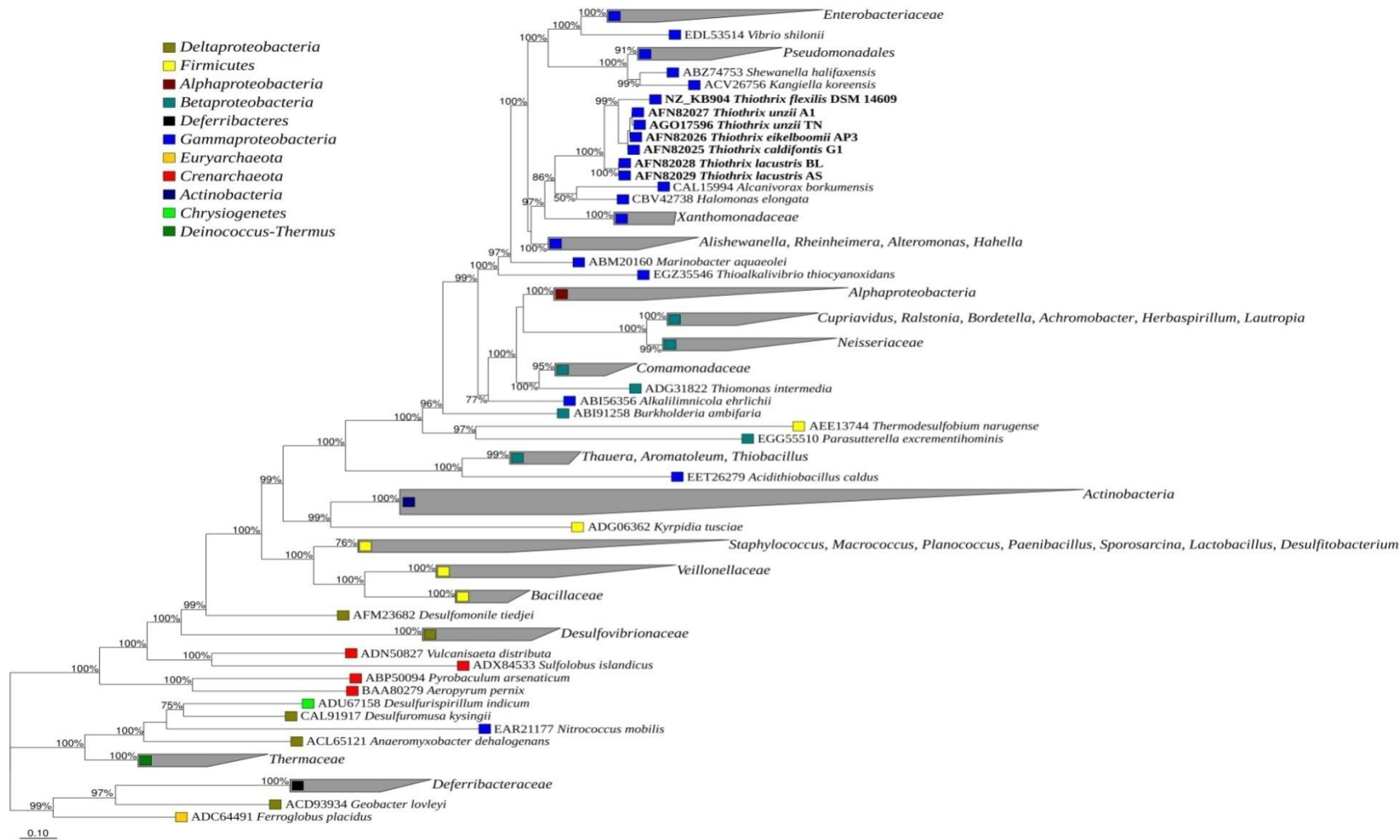


Рис. 37. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей альфа-субъединицы дыхательной нитратредуктазы (NarG).

Цифрами показана достоверность ветвления (представлены значения более 50 %). Масштаб соответствует 10 % различию между аминокислотными последовательностями.

3.2. Исследование метаболических путей восстановления нитрита при анаэробном дыхании у представителей рода *Thiothrix*

На сегодня для прокариот показаны следующие пути диссимиляционного восстановления нитратов (рис. 38):

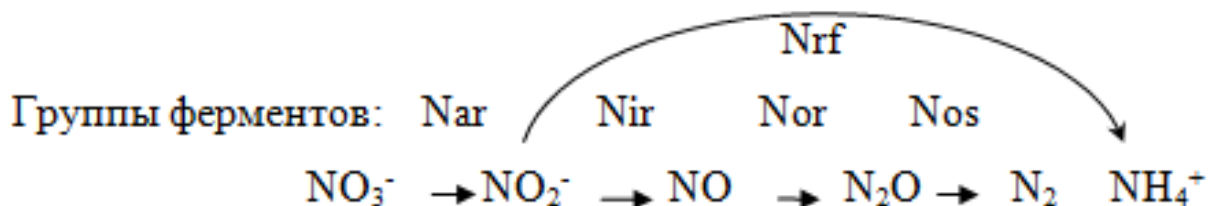


Рис. 38. Возможные пути восстановления нитратов при анаэробном дыхании прокариот.

Важно было выяснить способны ли представители рода *Thiothrix* к дальнейшему восстановлению нитритов, то есть способны ли они к денитрификации.

Мы проверили способность представителей рода *Thiothrix*, у которых был обнаружен ген *narG*, к образованию N_2 при анаэробном росте в присутствии нитратов и закиси азота. В этом эксперименте бактерии культивировали в анаэробных условиях во флаконах с газовой фазой (1:1): газовую фазу при анаэробном росте в присутствии нитратов создавали вытеснением воздуха аргоном, а газовую фазу при анаэробном росте в присутствии N_2O создавали вытеснением воздуха N_2O .

Нам удалось зафиксировать увеличение концентрации молекулярного азота (в 3-4 раза возрастала концентрация N_2 в % от газовой фазы) при росте на нитратах у *T. caldifontis* G1 и G3, *T. unzii* A1, *T. lacustris* AS, а при росте в присутствии N_2O - у *T. caldifontis* G1 и G3, *T. unzii* A1 и TN, *T. lacustris* AS. Процесс роста сопровождался увеличением белка (до 10 мг/л) и окислением тиосульфата (до 1 мМ).

Полученные предварительные данные свидетельствуют о возможности денитрификации с восстановлением нитратов до молекулярного азота.

Детальное исследование этого процесса у представителей рода *Thiothrix* представляет важнейшую задачу изучения анаэробного метаболизма этой группы серобактерий. Для выяснения этого процесса мы использовали молекулярные методы исследования.

3.2.2. Скрининг функциональных генов, участвующих в диссимиляционных реакциях восстановления нитритов, окиси и закиси азота

3.2.2.1. Детекция нитритредуктазы

Для подтверждения наличия нитритного дыхания, в результате которого нитриты восстанавливаются до NH_4^+ (ген *nrfA*) или NO (гены *nirS* или *nirK*) была проведена идентификация соответствующих генов у представителей рода *Thiothrix*.

Детекция *nrfA*. Реакцию восстановления нитритов до аммония осуществляет нитритредуктаза NrfA. По результатам амплификации с праймерами *nrfAF1/nrfA7R1* наличие ПЦР продукта ожидаемой длины в 520 п.н. ни у одного из изучаемых организмов не было выявлено, что согласуется с отсутствием в среде культивирования ионов аммония.

Детекция *nirS*. Для идентификации гена *nirS* использовалась пара праймеров *nirS1F-E7/nirS6R-F7*. ПЦР амплификация геномной ДНК штаммов *Thiothrix* дала продукт ожидаемой величины (850-870 п.н.) только для штамма *T. lacustris* AS (рис. 39).

Определение нуклеотидной последовательности полученного продукта подтвердило наличие гена *nirS* у указанного штамма. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена *nirS* штамма *T. lacustris* AS была помещена в GenBank под номером KC855765.

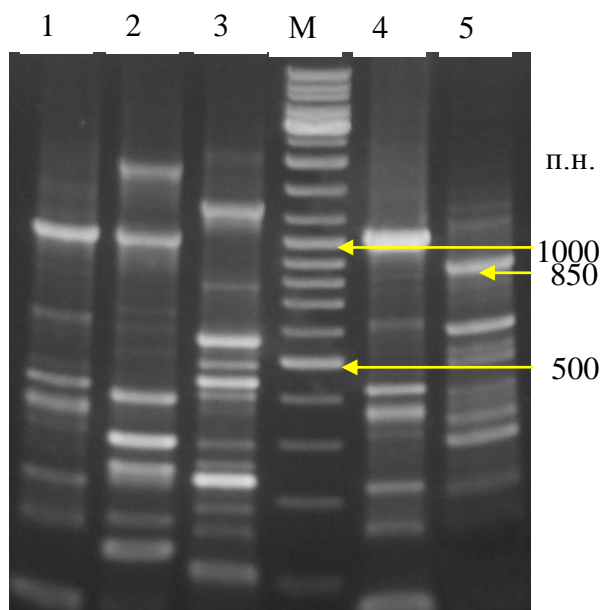


Рис. 39. Электрофорез в агарозном геле (1,2 %) продуктов ПЦР-амплификации, полученных с праймерами к гену *nirS*(*nirS*1F-E7/*nirS*6R-F7).

1 – *T. eikelboomii* AP3^T, 2 – *T. lacustris* BL^T, 3 – *T. caldifontis* G1, 4 – *T. unzii* A1^T, 5 – *T. lacustris* AS. М – маркеры ДНК MassRuler DNA LadderMix.

На основе полученной нуклеотидной последовательности фрагмента гена *nirS* из штамма *T. lacustris* AS, а также последовательностей генов *nirS*, доступных в базе данных NCBI (*Alphaproteobacterium* 4N: JX827176, *Paracoccus* sp. R-26466: AM230902, *Halomonas denitrificans* A113: GQ384047, Uncultured bacterium clone M-E6: HQ427982) была разработана пара специфичных праймеров. Последовательности были выровнены с использованием программы Alibee – Multiple Alignment, были идентифицированы консервативные участки, имеющиеся практически во всех выровненных последовательностях. К данным участкам были подобраны специфичные праймеры: *nirS*_AS-F и *nirS*_AS-R, позволяющие амплифицировать фрагмент гена *nirS* величиной 412 пар нуклеотидов (рис. 40).

ПЦР со специфичными праймерами показала наличие продуктов еще у трех штаммов: *T. unzii* A1^T, *T. caldifontis* G1^T, *T. caldifontis* G3 (рис. 41).

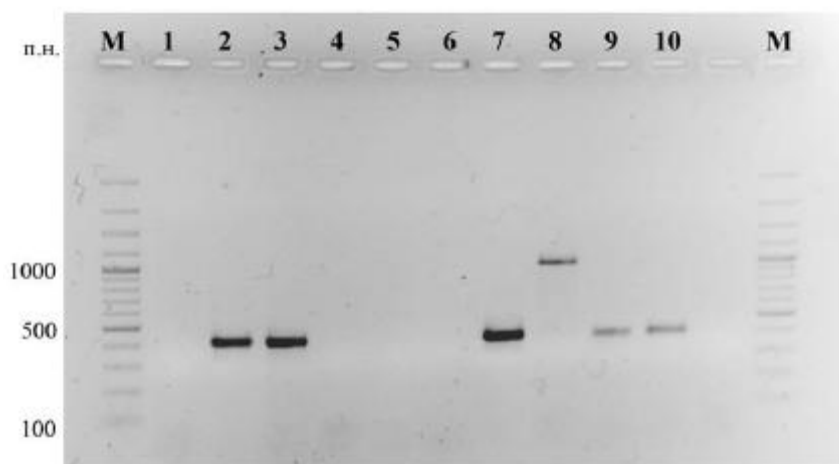


Рис. 41. Электрофорез в агарозном геле (1,2%) продуктов ПЦР-амплификации, полученных с использованием специфичных праймеров (*nirS*_AS-F и *nirS*_AS-R) к гену *nirS*.

1 – *T. eikelboomii* AP3^T; 2, 3 – *T. unzii* A1^T; 4 – *T. unzii* TN; 5 – *T. nivea* DSM 5205^T; 6 – *T. flexilis* EJ2M-B^T; 7 – *T. lacustris* AS; 8 – *T. lacustris* BL^T; 9 – *T. caldifontis* G1^T; 10 – *T. caldifontis* G3. М – маркеры ДНК O'GeneRuler 100 bpPlus DNA Ladder.

Таблица 11. Процент сходства полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностями гена *nirS*.

Виды штаммы	AS	A1 ^T	G1 ^T	G3	R 125	NBP39	BP47
<i>T. lacustris</i> AS	100 %	-	-	-	-	-	-
<i>T. unzii</i> A1 ^T	84 %	100 %	-	-	-	-	-
<i>T. caldifontis</i> G1 ^T	84 %	95 %	100 %	-	-	-	-
<i>T. caldifontis</i> G3	83 %	95%	96 %	100 %	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. R125	75 %	73 %	74 %	72 %	100 %	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. NBP39	74 %	73 %	74 %	73 %	92 %	100 %	-
<i>Pseudomonas</i> sp. BP47	74 %	73 %	74 %	72 %	92 %	99 %	100 %

Для *T. lacustris* AS из клеток, выросших как в аэробных, так и в анаэробных условиях, была получена и очищена тотальная РНК. С помощью обратной транскрипции со специфичными для гена *nirS* праймерами была получена кДНК и проведена ОТ-ПЦР. Сравнительный анализ показал, что в пробах, содержащих кДНК, полученную из мРНК культуры, растущей в

анаэробных условиях, наблюдался интенсивный синтез ампликонов, тогда как в пробах, соответствующих аэробному росту, синтеза данного продукта не было (рис. 42). Показано, что при анаэробном культивировании наблюдается экспрессия гена *nirS*, а результаты ОТ-ПЦР в пробах из аэробной культуры указывают на отсутствие экспрессии гена *nirS* при аэробном культивировании.

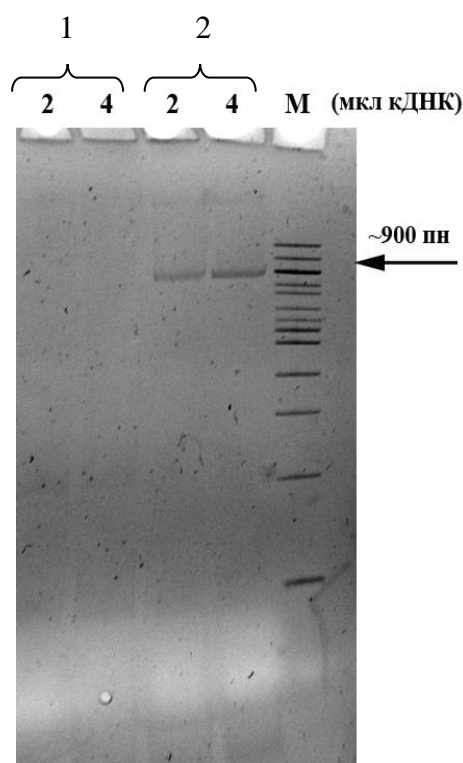


Рис. 42. Анализ уровня экспрессии гена *nirS* у штамма *T. lacustris* AS при культивировании в анаэробных условиях относительно аэробных.

1 – аэробные условия культивирования, 2 – анаэробные условия культивирования, М – маркеры ДНК 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs).

В результате проведения филогенетического анализа полученных нуклеотидных последовательностей гена *nirS* нитчатых бактерий рода *Thiothrix* было построено филогенетическое дерево: последовательность гена *nirS* штаммов рода *Thiothrix* тесно сгруппированы и являются частью филогенетического кластера, объединяющего большинство представителей класса *Gamma*proteobacteria (рис. 43).

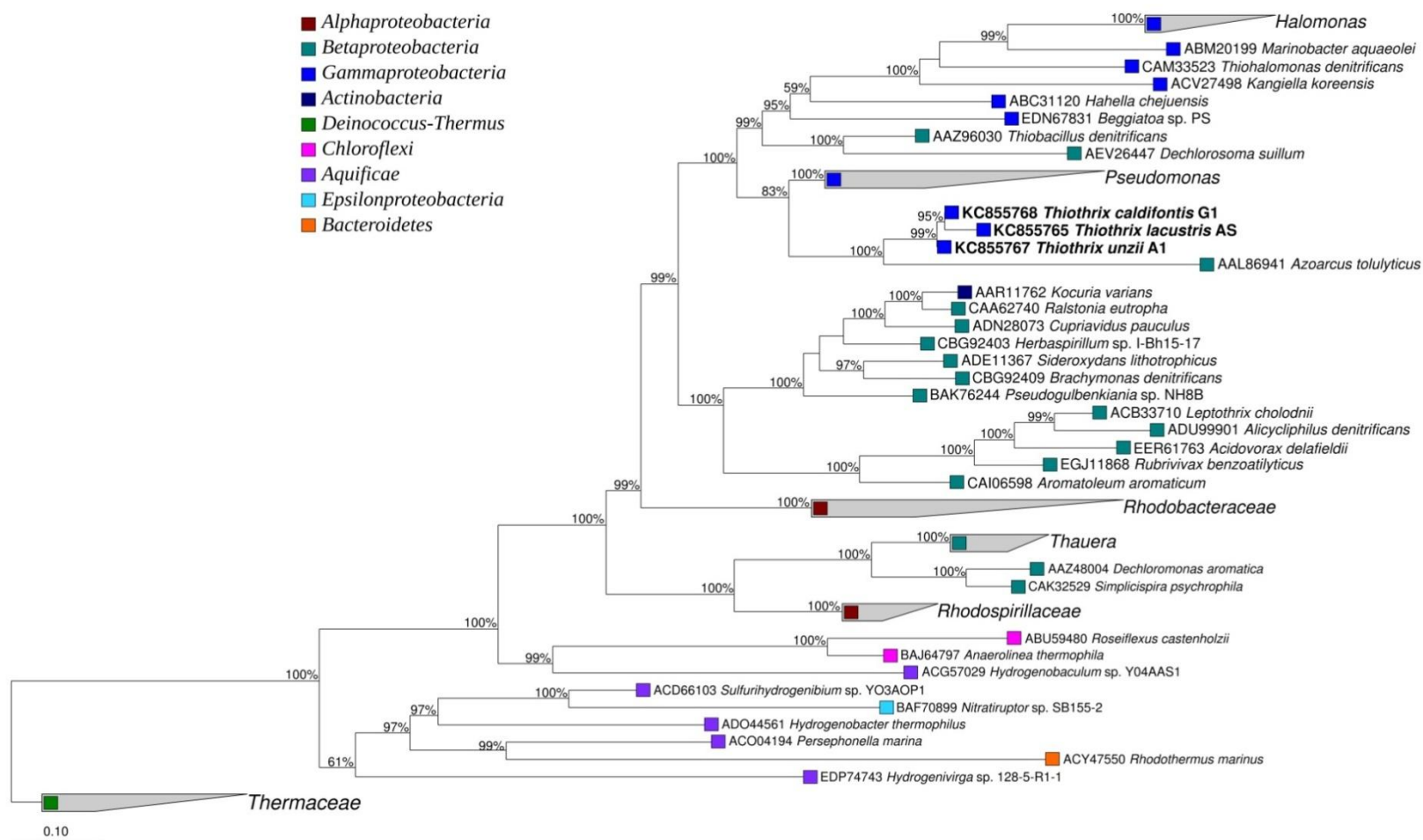


Рис. 43. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей цитохром-зависимой нитритредуктазы (NirS).

Цифрами показана достоверность ветвления (представлены значения более 50 %). Масштаб соответствует 10 % различию между аминокислотными последовательностями анализа фрагментов гена *nirS*.

Детекция гена *nirK*. Реакцию восстановления нитритов до окиси азота, как известно, могут осуществлять взаимоисключающие диссимиляционные нитритредуктазы, кодируемые генами *nirK* и *nirS* (Smith *et al.*, 2007). По результатам амплификации участка гена *nirK* с праймерами (*nirK1F/nirK5R*) наличие ПЦР продукта ожидаемой длины (514 п.н.) ни у одного из изучаемых организмов не было выявлено. В связи с вышесказанным мы можем предположить, что *T. nivea* JP2^T, *T. lacustris* BL^T, *T. unzii* TN, *T. eikelboomii* AP3^T и *Thiothrix flexilis* EJ2M-B^T, у которых не был обнаружен ген *nirS* и ген *nirK*, не способны к восстановлению нитритов до окиси азота.

3.2.2.2. Детекция NO-редуктазы и N₂O-редуктазы

Для обнаружения генов *snorB* и *qnorB*, кодирующих цитохром-с и хинол-зависимые NO-редуктазы, использовались вырожденные праймеры *snorB2F/snorB6R* и *qnorB2F/qnorB7R* соответственно. По результатам амплификации участка гена *snorB* продукты ожидаемой длины (390 п.н.) были получены для штаммов *T. unzii* TN, *T. lacustris* AS и *T. caldifontis* G3.

Продукты были очищены, определены их нуклеотидные последовательности. Полученные последовательности гена *snorB* были помещены в GenBank под номерами KF977407 (*T. unzii* TN), KF926095 (*T. lacustris* AS), KJ419278 (*T. caldifontis* G3). У других исследованных штаммов рода *Thiothrix*–*T. nivea* JP2^T, *T. lacustris* BL^T, *T. caldifontis* G1^T, *T. eikelboomii* AP3^T, *T. flexilis* EJ2M-B^T не были обнаружены продукты гена *snorB*.

На основе полученных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *snorB* из штаммов *T. lacustris* AS, *T. caldifontis* G3 и *T. unzii* TN была разработана пара специфичных праймеров: *snorBThF/snorBThR*, позволяющих амплифицировать фрагмент гена *snorB* величиной 208 пар нуклеотидов.

ПЦР амплификация геномных ДНК штаммов *Thiothrix* с использованием специфичных праймеров показала наличие продуктов еще у двух штаммов (рис. 44). Полученные фрагменты генов *cnorB* были помещены в GenBank под номерами KJ748493 (*T. unzii* A1^T), KJ748494 (*T. caldifontis* G1^T).

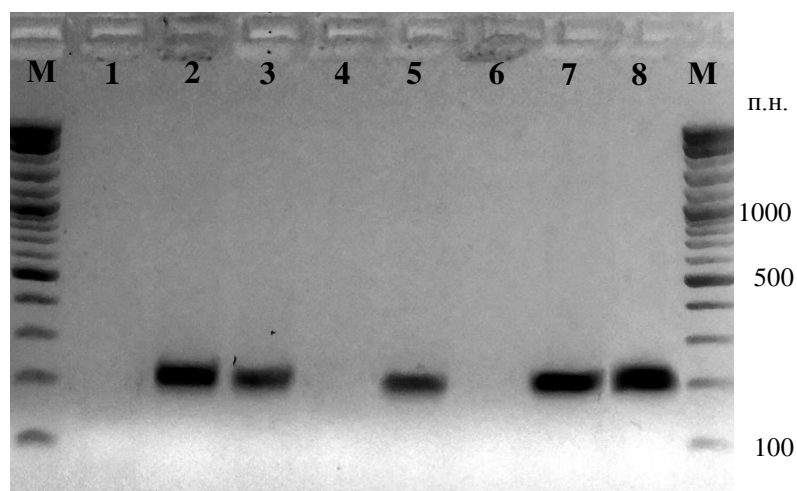


Рис. 44. Электрофорез в агарозном геле (1,2 %) продуктов ПЦР-амплификации, полученных с использованием специфичных праймеров *cnorB*ThF/*cnorB*ThR.

1 – *T. eikelboomii* AP3^T; 2 – *T. unzii* A1^T; 3 – *T. unzii* TN; 4 – *T. nivea* DSM 5205^T; 5 – *T. lacustris* AS; 6 – *T. lacustris* BL^T; 7 – *T. caldifontis* G1^T; 8 – *T. caldifontis* G3. М – маркеры ДНК O'GeneRuler DNA LadderMix.

Степень сходства полученных последовательностей гена *cnorB* представлена в таблице 12.

Таблица 12. Процент сходства полученных нуклеотидных последовательностей гена *cnorB*

	AS	G3	TN	NH8B
<i>T. lacustris</i> AS	100 %	-	-	-
<i>T. caldifontis</i> G3	86 %	100 %	-	-
<i>T. unzii</i> TN	90 %	94 %	100 %	-
<i>Pseudogulbenkiania</i> sp. NH8B	79 %	77 %	79 %	100 %

Филогенетический анализ последовательностей генов *cnorB* показал, что последовательности из представителей *Thiothrix* плотно сгруппирована, но эта группа окружена последовательностями в основном, принадлежащими представителям *Betaproteobacteria* (рис. 45). Полученные результаты могут означать, что ген *cnorB* был подвергнут горизонтальному переносу генов перед разделением современных видов рода *Thiothrix* из последнего общего предка этого рода.

По результатам амплификации участка гена *qnorB* с праймерами *qnorB2F* и *qnorB7R* наличие ПЦР продукта ожидаемой длины (637 п.о.) ни у одного из изучаемых организмов не было выявлено. Полученные результаты подтверждают общую закономерность, в соответствии с которой гены, кодирующие ферменты одного и того же участка одного метаболического пути обычно взаимоисключают друг друга (в нашем случае гены *cnorB* и *qnorB*).

Для обнаружения одного из генов (*nosZ*), кодирующих N₂O-редуктазу (*NosRZDFYLYX*), были использованы вырожденные праймеры *Nos661F/Nos1773R* (1112 п.о.) и *nosZF/nosZR* (700 п.н.). По результатам амплификации участка гена *nosZ* продукты ожидаемой длины ни у одного из изучаемых организмов не были выявлены.

Однако учитывая способность некоторых представителей рода *Thiothrix* при анаэробном дыхании образовывать молекулярный азот при росте на нитратах и закиси азота (см. раздел 3.2.), мы можем предположить наличие гена *nosZ* у этих бактерий. Вероятно, используемые праймеры не подходят для данной группы бактерий. В пользу вышесказанного говорит и тот интересный факт, что у *T. unzii* TN, у которого не был обнаружен ген *nirS*, а был выявлен ген *cnorB*, образование молекулярного азота наблюдалось только при росте культур в присутствии N₂O, тогда как при росте на нитратах увеличение концентрации молекулярного азота не удалось зафиксировать.

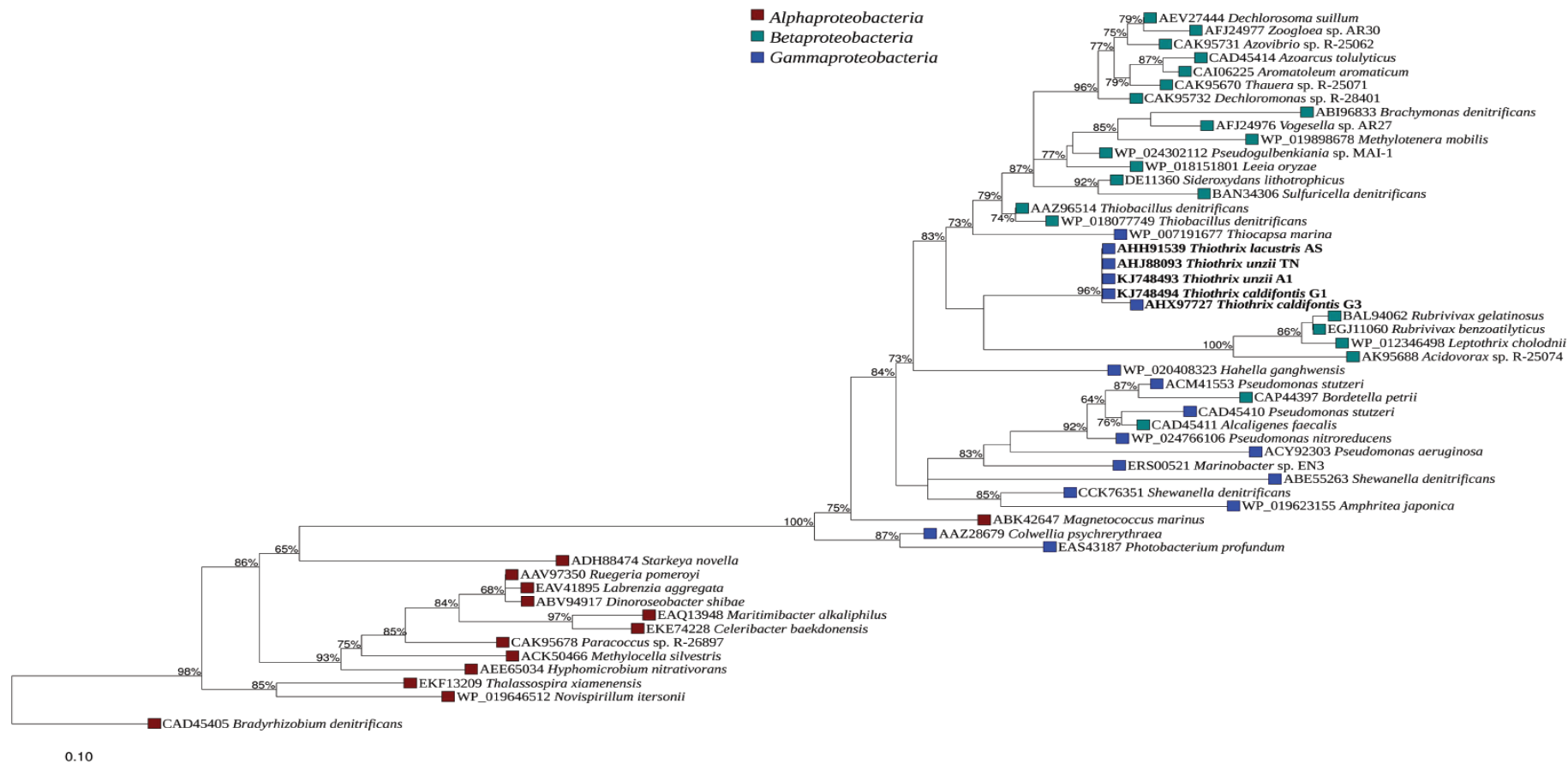


Рис. 45. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей NO-редуктазы, субъединицы В (*snorB*).

Цифрами показана достоверность ветвления (представлены значения более 50 %). Масштаб соответствует 10 % различию между аминокислотными последовательностями анализа фрагментов гена *snorB*.

3.3. Связь экологических наблюдений с молекулярно-биологическими исследованиями.

При сопоставлении физико-химических параметров среды обитания штаммов *T. lacustris* и *T. unzii* способных наряду с аэробным ростом к анаэробному, было показано, что способность к нитритредукции у штаммов одного вида, выделенных из различных условий обитания, согласно нашим экологическим наблюдениям, коррелирует с низкой концентрацией сероводорода (1-2 мг/л), концентрацией кислорода в пределах 2-4 мг/л при слабой скорости протока или в застойных водах (очистные сооружения), а отсутствие способности к нитритредукции – с высокой концентрацией сероводорода (9-10 мг/л), низкой концентрацией нитратов, следовыми концентрациями кислорода (< 1 мг/л), высокой скоростью протока и высокой турбулентностью (табл.13).

Для представителей рода *Thiothrix*, ведущих прикрепленный образ жизни, в условиях постоянно меняющегося кислородного режима в местах обитания способность к двум типам дыхания – аэробному и анаэробному имеет большое адаптационное значение. Сопоставление метаболических путей диссимиляционного восстановления нитратов и физико-химических параметров условий роста различных представителей рода *Thiothrix* позволяет более убедительно обосновать зависимость метаболического разнообразия серобактерий от окислительно-восстановительных условий их мест обитания. Нам также было важно выяснить, насколько сильно влияют экологические факторы на образование новых таксонов в пределах рода *Thiothrix*. Сравнительный анализ функциональных генов и мест обитания штаммов следующих видов – *T. unzii*, *T. caldifontis* и *T. lacustris* позволил выявить существенные различия на уровне штаммов (табл. 13).

Таблица 13. Способность к восстановлению оксидов азота у представителей рода *Thiothrix* в зависимости от условий среды

Вид	Штамм	Место выделения	Физико-химические условия обитания					Процесс анаэробного дыхания, наличие генов нитратредукции	Гомология, %				
			Т °С	[H ₂ S], мг/л	[O ₂], мг/л	[NO ³⁻], мг/л	Скорость протока		16S рPHK	<i>gyrB</i>	<i>narG</i>	<i>nirS</i>	<i>cnorB</i>
<i>T. lacustris</i>	BL ^T	Пресное озеро	9,3	9 (3*)	следы	0,26	высокая	NO ₃ ⁻ →NO ₂ ⁻ <i>narG</i>	100	95,2	98	-	-
	AS [†]	Пресноводный ручей, на литорали Белого моря	9-12	1-2	2-4	5-6	низкая	NO ₃ ⁻ →NO ₂ ⁻ →NO→N ₂ O→N ₂ [‡] <i>narG, nirS, cnorB</i>					
<i>T. uzii</i>	A1 ^T	Активный ил очистных сооружений	Н.д.	Н.д.	Н.д.	5-6	низкая	NO ₃ ⁻ →NO ₂ ⁻ →NO→N ₂ O→N ₂ [‡] <i>narG, nirS, cnorB</i>	99	93,6	94	-	97
	TN	Сероводородный ручей	24	10-14	следы	0,1-0,2	высокая	NO ₃ ⁻ →NO ₂ ⁻ ; NO→N ₂ O→N ₂ [‡] <i>narGcnorB</i>					
<i>T. caldifontis</i>	G1 ^T	Устье сероводородного источника	40	(1-3) - 8 [§]	2-4	5-6	низкая	NO ₃ ⁻ →NO ₂ ⁻ →NO→N ₂ O→N ₂ [‡] <i>narG, nirS, cnorB</i>	99,9	98,0	93	96	96 [¶]
	G3	Сероводородный ручей	40	(1-3) - 8 [§]	2-4	5-6	низкая	NO ₃ ⁻ →NO ₂ ⁻ →NO→N ₂ O→N ₂ [‡] <i>narG, nirS, cnorB</i>					

*Во время сезона дождей.

[†]Умеренногалофильные

[‡]N₂, образование молекулярного азота было определено на газовом хроматографе; ген *posZ* не был обнаружен

[§]H₂S концентрация варьировала незначительно в течении дня

[¶]Выравненные последовательности G1 (GenBank accession no.KJ748494) and G3

(GATTACCGGCATCATCGGTACAGGGCATCACTTTTACTGGATTGGTGCGCCGGGATACTGGCAATGGTGGGGGTCGATTTTCTCGGC
ACTTGAACCGATTCCGTTCTTCATTATGACGCTGTTTGCCTTCAATGTGATCAATAAGCGCAAGCGCGAACACCCCAACAAAGCAGCA
GTGTTGTGGGCAATGGGTACAGCCGTA CTGGC) сравнивались.

Гомология нуклеотидных последовательностей гена *gyrB* у представителей рода *Thiothrix*, кодирующего АТФ-азный домен ДНК-гиразы, соответствует подвидовому уровню (Goh *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Черноусова Е. Ю., 2012), данные по функциональным генам, участвующим в денитрификации, также указывают на существенные различия между штаммами одного вида, выделенные из разных мест обитания.

Существование достаточно выраженной генетической гетерогенности у ряда штаммов *Thiothrix* одного вида, имеющих сходные фенотипы, может свидетельствовать о накоплениях в ходе эволюции нейтральных изменений в их нуклеотидных последовательностях, обнаруживаемых с помощью генетических методов, и не сопровождающихся аналогичными изменениями на уровне фенотипа, но ведущие к образованию подвидов и в дальнейшем новых видов.

ГЛАВА 4. ОБУСЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Схема очистки респираторной нитратредуктазы и особенности полученного препарата белка

В данной работе для выделения респираторной нитратредуктазы из *T. lacustris* AS была применена специально разработанная схема быстрой четырехстадийной очистки фермента. В результате был выделен и очищен до электрофоретически гомогенного состояния ключевой фермент процесса диссимиляционной нитратредукции – респираторная нитратредуктаза NarGH. Респираторная нитратредуктаза является комплексом из 3 субъединиц: NarG, NarH, NarI. Выделенный препарат респираторной нитратредуктазы NarGH из *T. lacustris* AS представляет собой гетеродимер с молекулярной массой субъединиц NarG – около 100 кДа и NarH – около 80 кДа. Потеря субъединицы NarI вероятно произошла в процессе очистки фермента, что иногда встречается в процессе очистки респираторной нитратредуктазы (Zumft, 1997). Субъединица NarI закрепляет весь комплекс на внутренней стороне мембраны и осуществляет транспорт электронов к активному центру, тем самым не влияя непосредственно на каталитическую активность нитратредуктазы.

В лабораторных условиях нитратредуктаза получает электроны от восстановленного метилвиологена, что позволило исследовать все основные физико-химические параметры и кинетические характеристики фермента без вспомогательной субъединицы NarI.

На полученном препарате белка были изучены физико-химические и кинетические характеристики респираторной нитратредуктазы, выявлены сходства и различия с нитратредуктазами других прокариот. Одним из отличий данного фермента от изученных ранее является величина субъединицы NarH – 80 кДа, при том, что у большинства организмов молекулярная масса NarH не превышает 70 – 75 кДа.

Анаэробное культивирование *T. lacustris* AS характеризуется низким относительным приростом биомассы. С другой стороны, применяемая в данной работе схема очистки нитратредуктазы требовала большой объем биомассы (по причине низкого выхода белка, в связи с особенностями примененных методов очистки). Для решения этой проблемы была разработана специальная схема культивирования, при которой бактерии культивировались в ферментерах аэробных условиях с непрерывным перемешиванием и аэрацией. В таких условиях объем биомассы возрастал в 20 – 40 раз за 72 часа культивирования. При достижении максимального прироста биомассы аэрацию прекращали и культивировали бактерии еще 24 часа в анаэробных условиях, что приводило к индукции синтеза бактериями респираторной нитратредуктазы. Таким образом, удалось в короткие сроки получить большой объем биомассы, содержащей исследуемый фермент.

4.1.2. Разработка схемы очистки фермента и обоснование использования конкретных методов

В данной работе для очистки фермента были использованы методы колоночной хроматографии и препаративного электрофореза в полиакриламидном геле. Остановимся подробнее на каждой ступени очистки.

Первым этапом после получения супернатанта стала гель-фильтрация на Superdex 200.

Предварительно посредством постановки электрофореза в ПААГ и специфического окрашивания на нитратредуктазную активность нами была определена масса искомого фермента, она составила 170 – 180 кДа. Это позволило посредством гель-фильтрации убрать все фракции с белком молекулярной массой менее 150 кДа (рис. 46).

Таким образом, удалось более чем в 3 раза снизить общий объем белка без существенной потери активности. Единственным негативным последствием использования гель-фильтрации стало сильное разбавление

препарата белка. Данная проблема была решена на следующей стадии очистки.

Анионообменная хроматография на колонке Mono Q HR 16/10 помимо разделения белков по заряду позволила сконцентрировать белковый препарат. Важной особенностью данного типа колонок является то, что объем внесения не имеет значения и может многократно превышать объем самой колонки. По этой причине именно анионообменная хроматография была выбрана вторым этапом очистки.

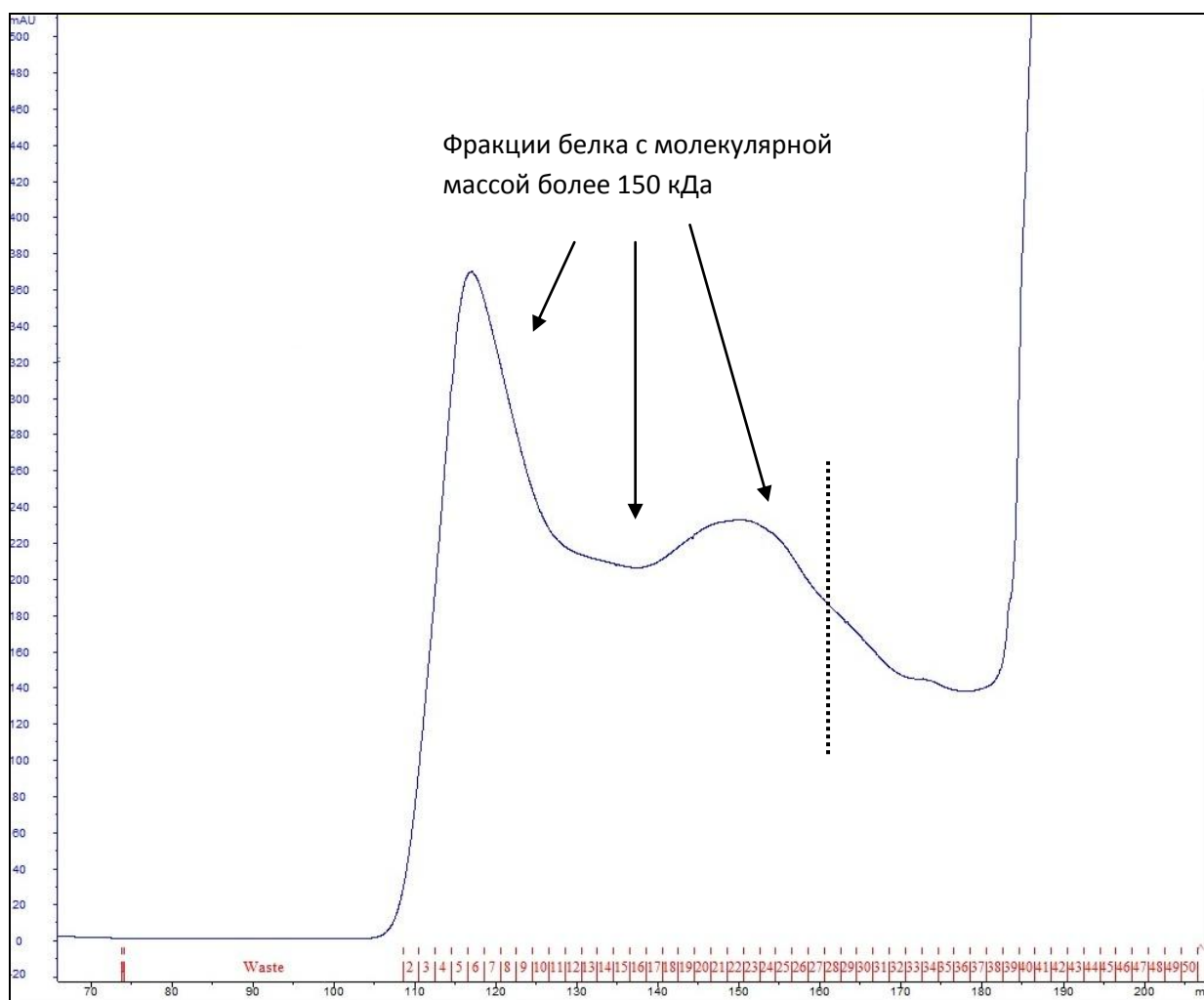


Рис. 46. Профиль элюции белка на колонке Superdex 200. Для дальнейшей работы были отобраны фракции, содержащие белок с молекулярной массой более 150 кДа.

Предварительно была экспериментально рассчитана концентрация NaCl, необходимая для элюции нитратредуктазы. Белок элюировали в узком

градиенте NaCl, что позволило снизить общий объем белка в 8 раз. Так же на выходе мы получили концентрированный препарат белка в небольшом объеме (рис. 47), что позволило использовать в качестве следующего этапа очистки препаративный электрофорез.

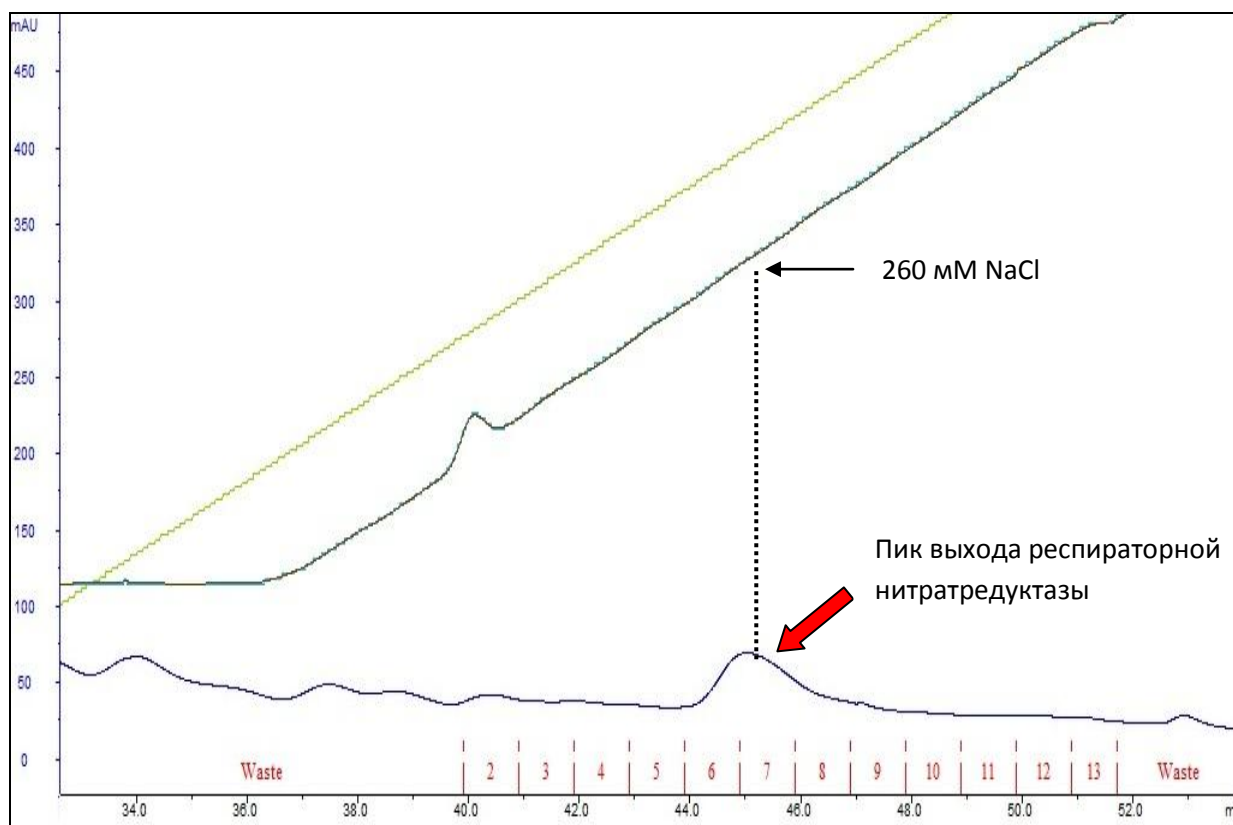


Рис. 47. Профиль элюции белка в узком градиенте концентрации NaCl 150 – 350 мМ.

Для проведения электрофореза использовали полиакриламидный гель с градиентом концентрации разделяющего геля 4 – 10 %. Это позволило получить узкую полосу целевого белка.

Целесообразность применения препаративного электрофореза в ПААГ в качестве этапа очистки фермента является спорной, так как в процессе электрофореза неизбежен нагрев разделяющего геля даже при использовании дополнительного охлаждения. Так же уже по завершении процесса может возникнуть ряд проблем с выделением белка из геля. В нашем случае данный метод был выбран по двум причинам. Во-первых, респираторная нитратредуктаза NarGHI из *Thiothrix lacustris* AS является

термостабильным ферментом. Термостабильность нитратредуктазы была определена ранее на частично очищенном препарате. Во-вторых, при использовании электрофореза удалось снизить общий объем белка в 11-12 раз.

Для перехода белка в растворенное состояние полоску геля, содержащую белок вырезали, измельчили и смешали с 30-кратным объемом буфера. Большой объем буфера был взят для облегчения диффузии, так как для перехода белка в раствор электрический ток, или же какие либо другие дополнительные средства не применялись.

Таким образом, был получен большой объем препарата белка с низкой концентрацией и степенью очистки 33. Для изучения свойств нитратредуктазы требовалось дочистить и сконцентрировать препарат. С этой целью была повторно использована анионообменная хроматография на колонке MonoQ. Для элюции использовали более широкий градиент NaCl, сократив при этом продолжительность элюции, что привело к концентрированию препарата белка на выходе. Для дальнейшей работы была отобрана фракция, соответствующая не всему пику белка, а лишь его центру. Это позволило получить гомогенный препарат респираторной нитратредуктазы в концентрации, достаточной для дальнейшей работы по изучению свойств фермента.

Недостатком примененной схемы очистки можно назвать большие потери целевого белка на стадии электрофореза и повторной анионообменной хроматографии. В первом случае потери белка неизбежны в связи с особенностями метода: в процессе электрофореза неизбежна денатурация части молекул белка (даже термостабильного) по причине нагревания, а по завершении процесса для перехода белка из частиц геля в раствор используется диффузия, при этом часть белка неминуемо остается в геле. В случае с анионообменной хроматографией излишних потерь белка можно избежать, отобрав весь пик выхода белка, а не его середину. Однако,

при этом возрастает риск загрязнения препарата белка посторонними примесями.

В целом считаем данную схему очистки оптимальной для выделения диссимиляционной нитратредуктазы NarGH_I из *Thiothrix lacustris* AS.

4.2. Особенности диссимиляционной нитратредукции у представителей рода *Thiothrix*

Впервые у широкого круга представителей рода *Thiothrix* исследована способность к анаэробному дыханию в присутствии нитратов. Были исследованы семь видов из девяти, поддерживаемых в международных коллекциях микроорганизмов (*T. nivea* JP2^T, *T. lacustris* BL^T, *T. lacustris* AS, *T. caldifontis* G1^T, *T. unzii* A1^T, *T. unzii* TN, *T. eikelboomii* AP3^T, *T. disciformis* B3-1^T, *T. flexilis* EJ2M-B^T). У восьми штаммов пяти видов (*T. lacustris* BL^T, AS, *T. caldifontis* G1^T, G3, *T. unzii* A1^T, TN, *T. eikelboomii* AP3^T, *T. flexilis* EJ2M-B^T) обнаружена способность к анаэробному нитратному дыханию.

Исследована динамика процесса восстановления нитрата до нитрита. У исследованных представителей рода *Thiothrix* выявлено наличие в клетках гена *narG*, кодирующего альфа-субъединицу респираторной нитратредуктазы NarGH_I. Показано, что у штамма *T. lacustris* AS при анаэробном культивировании индуцируется экспрессия данного гена.

Вопрос о дальнейшем восстановлении нитритов оставался открытым. С целью выяснения этого вопроса у 4 видов из 9, поддерживаемых в международных коллекциях микроорганизмов, нами была исследована способность к денитрификации, т.е. к восстановлению оксидов азота до газообразных продуктов (табл. 14). Оказалось, что 5 штаммов из 3 видов обладают способностью к денитрификации. *T. lacustris* AS, *T. caldifontis* G1^T, *T. caldifontis* G3, *T. unzii* A1^T способны восстанавливать нитрит до окиси и закиси азота (обнаружены гены *nirS*, кодирующий фермент нитритредуктазу NirS и показана его экспрессия в анаэробных условиях, *cnorB*, кодирующий цитохром *c* зависимую NO-редуктазу), тогда как у *T. unzii* TN не был

обнаружен ген *nirS*, но выявлен ген *cnorB*. Таким образом, *T. unzii* TN не способен к нитритному дыханию (не обнаружены гены *nirS*, *nirK* и *nrfa*), но способен к нитратному дыханию (обнаружен рост в анаэробных условиях в присутствии нитратов и ген *narG*) и к анаэробному дыханию в присутствии NO ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$; $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$), т.е. у него наблюдается «усеченная» денитрификация.

Таблица 14. Способность к осуществлению отдельных этапов денитрификации у представителей рода *Thiothrix*.

Этапы денитрификации и параметры, указывающие на их наличие		<i>T. lacustris</i> AS	<i>T. lacustris</i> BL _T	<i>T. unzii</i> AI ^T	<i>T. unzii</i> TN	<i>T. caldifontis</i> GI ^T	<i>T. eikelboomii</i> AP3 ^T
$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	Ген <i>narG</i>	+	+	+	+	+	+
	Продукт	+	+	+	+	+	+
$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$	Ген <i>nirS</i>	+	-	+	-	+	-
	Продукт	но	но	но	но	но	но
$\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$	Ген <i>cnorB</i>	+	-	+	+	+	-
	Продукт	но	но	но	но	но	но
$\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$	Ген <i>nosZ</i>						
	Продукт	+	но	+	+	+	но

но – не определяли; * - N_2 был обнаружен только при росте с N_2O

Известно, что гены, ответственные за процессы нитратного (*nar*) и нитритного (*nir*) дыхания, а также, дыхания на NO (*nor*) и N_2O (*nos*), расположены в кластерах. У разных организмов отдельные кластеры могут быть локализованы слитно. Такая локализация в живой клетке приводит к тому, что гены нескольких ферментов одного метаболического пути экспрессируются сразу.

Однако существует немало бактерий, способных осуществлять только отдельные этапы респираторной денитрификации. У таких организмов могут отсутствовать некоторые гены азотного метаболизма (а

иногда и целые кластеры), а имеющиеся гены локализованы так, чтобы в соответствующих условиях внешней среды индуцировались только «нужные» ферменты (Zumft, 1997). Вероятно последнее имеет место у *T. unzii* TN.

У двух штаммов 2 видов, способных к нитратному дыханию (*T. lacustris* BL^T, *T. eikelboomii* AP3^T), способности к денитрификации не было обнаружено. Эти данные подтверждены отсутствием генов соответствующих ферментов, участвующих в этом процессе. Это можно утверждать и для *T. nivea* JP2^T (Lapidusetal., 2011), *T. flexilis* EJ2M-B^T (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/14260>), *T. disciformis* B3-1^T (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/14257>) на основе анализа геномного сиквенса.

Ни один из исследованных представителей рода *Thiothrix* не обнаружил способности к диссимиляционному восстановлению NO₂⁻ до NH₃, что подтверждается как отсутствием гена *nrfA*, так и отсутствием накопления NH₃ в среде в качестве конечного продукта при анаэробном росте. Из двух альтернативных нитритредуктаз - NirS и NirK, ответственных за восстановление NO₂⁻ до NO, у всех исследованных штаммов ген *nirK* не был обнаружен. Также ни у одного штамма не был выявлен ген *qnorB*, кодирующий хинол зависимые NO-редуктазы. Полученные результаты подтверждают общую закономерность, в соответствии с которой гены, кодирующие ферменты одного и того же участка метаболического пути обычно взаимоисключают друг друга (в нашем случае гены *snorB* и *qnorB*, а также *nirS* и *nirK*).

Для штаммов, у которых обнаружен ген *nirS* или *snorB*, среди конечных продуктов анаэробного восстановления закиси азота, было зарегистрировано образование N₂ (4-х кратное увеличение по сравнению с исходным содержанием). Однако процесс восстановления закиси азота не был проанализирован количественно. Полученные предварительные данные свидетельствуют о возможности протекания дальнейшего восстановления

закиси азота до N_2 . Детальное исследование этого процесса у представителей рода *Thiothrix* представляет важнейшую задачу изучения анаэробного метаболизма этой группы серобактерий.

Впервые выявлена закономерность, заключающаяся в том, что способность к диссимиляционной нитритредукции и редукции окиси азота варьирует в пределах разных штаммов одного вида и коррелирует с концентрациями сероводорода, нитратов и кислорода, зависящими в значительной степени от скорости протока. Для представителей рода *Thiothrix*, ведущих прикрепленный образ жизни, в неравновесных условиях среды, способность к двум типам дыхания – аэробному и анаэробному – имеет большое адаптационное значение. Накопившиеся факты по исследованию сероводородных биотопов, различающихся разным генезисом и физико-химическими параметрам среды, позволили показать, что в зависимости от экологических условий в пределах таких видов, как *T. lacustris*, *T. unzii*, *T. caldifontis*, происходит формирование новых подвигов. Было показано, что при почти 100 % сходстве по гену 16S рРНК у разных штаммов одного вида, гомология по функциональным генам *gyrB*, *narG*, *nirS*, *snorB* соответствовала подвиговым различиям. Все это подтверждает ранее высказанное предположение, что разнообразие представителей «филогенетически молодого» рода *Thiothrix* на уровне фенотипа и генотипа является проявлением внутривидовой изменчивости на данном этапе эволюции этого рода.

Для представителей рода *Thiothrix* при реконструкции аминокислотных последовательностей субъединиц *NarG* и *NirS* на родовом уровне не было обнаружено значительных отклонений от общепринятой филогении этого рода, что свидетельствует об отсутствии недавних случаев горизонтального переноса соответствующих генов у исследованных представителей рода *Thiothrix*. Однако филогенетический анализ аминокислотных последовательностей субъединицы *SnorB* показал, что представители *Thiothrix*, относящихся к *Gamma*proteobacteria, плотно сгруппированы, но

окружены бактериями, в основном принадлежащими к *Betaproteobacteria*. Это может означать, что ген *snorB* был подвергнут горизонтальному переносу перед отделением современных видов от общего предка представителей *Thiothrix*.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показана способность к анаэробному нитратному дыханию для большинства представителей серобактерий рода *Thiothrix* на биохимическом и генетическом уровнях: изучена динамика восстановления нитратов до нитритов; обнаружена активность респираторной нитратредуктазы; обнаружен функциональный ген *narG*, кодирующий α -субъединицу респираторной нитратредуктазы NarGH_I, и показана его экспрессия в анаэробных условиях.

2. Выделен и очищен до электрофоретически гомогенного состояния ключевой фермент процесса диссимиляционной нитратредукции – респираторная нитратредуктаза NarGH, для чего была применена специально разработанная схема быстрой четырехстадийной очистки фермента. Степень очистки составила 78,3, удельная активность фермента – 97,75 Е/мг.

3. Выделенный препарат респираторной нитратредуктазы NarGH из *T. lacustris* AS представляет собой гетеродимер с молекулярной массой субъединиц NarG - 100 кДа и NarH - 80 кДа.

4. Определены физико-химические параметры респираторной нитратредуктазы из *T. lacustris* AS: температурный и рН оптимумы фермента, составили 63 °С и 7,25, соответственно; исследована термостабильность при 50 °С и 60 °С; ингибиторами фермента являются азид натрия и бета-меркаптоэтанол; оптимальный донор электронов – метилвиологен.

5. Определены кинетические характеристики изучаемого фермента: K_m по нитрату составила 0,234 мМ; V_{max} – 0,945 Е/мг белка, V_{max}/K_m – 4,03 в отношении нитрата.

6. Способность к денитрификации у представителей серобактерий рода *Thiothrix* подтверждена по способности образовывать N_2 *de novo* при анаэробном дыхании в присутствии оксидов азота и на молекулярном уровне: ген *nirS*, кодирующий нитритредуктазу, обнаружен у *T. lacustris*

AS; *T. caldifontis* G1^T, G3; *T. unzii* A1^T; показана экспрессия гена *nirS* для *T. lacustris* AS; ген *cnorB*, кодирующий цитохром-с зависимую NO-редуктазу, обнаружен у *T. lacustris* AS; *T. caldifontis* G1^T, G3; *T. unzii* A1^T, TN.

7. Показано, что ген *cnorB* был подвергнут горизонтальному переносу перед отделением современных видов рода *Thiothrix* из последнего общего предка этого рода, в то время, как гены *narG* и *nirS* были изначально представлены в геномах изучаемых микроорганизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грабович М. Ю. Биоразнообразие бесцветных серобактерий: таксономия, метаболизм и его регуляция: дисс... доктора биол. наук / М. Ю. Грабович. – Саратов, 2005. – 308с.
2. Диксон М. Ферменты / М. Диксон, Э. Уэбб // М.: Мир. – 1982. – Т. 1–3. – 1120 с.
3. Дубинина Г. А. Бесцветные серобактерии / Г. А. Дубинина // Хемосинтез. К 100-летию открытия С.Н. Виноградским. М.: Наука.– 1989. – С. 75–100.
4. Дубинина Г. А. Методы изучения водных микроорганизмов / Г. А. Дубинина, С. И. Кузнецов. – М.: Наука, 1989. – 288с.
5. Дульцева Н. М. Выделение морских нитчатых серобактерий и описание нового вида *Leucothrix thiophila* sp. nov. / Н. М. Дульцева, Г. А. Дубинина, А. М. Лысенко // Микробиология. – 1996. – Т. 65, № 1. – С. 89–98.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин // М.: Высш. шк. – 1990. – 351с.
7. Лукашов В. В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ / В. В. Лукашов // М.: Бином. – 2009. – С. 35–89.
8. Намсараев Б. Б. Бактериальный синтез и деструкция органического вещества в микробиальных матах озера Байкал / Б. Б. Намсараев [и др.] // Микробиология. – 1994. – Т. 63, № 2. – С. 344–351.
9. Одинцова Е. В. Новая бесцветная нитчатая серобактерия *Thiothrix ramosa* nov. sp. / Е. В. Одинцова, Г. А. Дубинина // Микробиология. – 1990. – Т. 59, № 4. – С. 437 – 445.
10. Одинцова Е. В. Роль восстановленных серных соединений в метаболизме *Thiothrix ramosa* / Е. В. Одинцова, Г. А. Дубинина // Микробиология. – 1993. – Т.62, №2. – С. 213 – 222.

11. Петушкова Ю. П. Окисление сульфита у *Thiocapsaroseopersicina*/ Ю. П. Петушкова, Р. Н. Ивановский // Микробиология. – 1976. – Т. 45, № 4. – С. 592–597.
12. Пименов Н. В. Трофическая специализация креветок – брезиилид в гидротермальном сообществе ТАГ / Н.В. Пименов [и др.] // Докл. РАН. – 1992. – Т. 323, № 3. – С. 567–571.
13. Резников А. А. Методы анализа природных вод. / А. А. Резников, Е. П. Муликовская, В. Ю. Соколов // Москва: Госгеолтехиздат. – 1970. – 488 с.
14. Розанова Е. П. Распространение сульфатвосстанавливающих бактерий в трубопроводах тепловой сети и причины появления в воде сероводорода / Е. П. Розанова, Л. А. Ентальцева // Микробиология. – 1999. – Т.68, №1. – С. 100 – 106.
15. Романова А. К. Биохимические методы изучения автотрофии у микроорганизмов. / А. К. Романова. М.: Наука, 1980. – 160с.
16. Уильямс У. Д. Определение анионов. / У. Д. Уильямс // Москва: Химия. –1982. – 622 с.
17. Черноусова Е. Ю. Молекулярная филогения и систематика бесцветных нитчатых серобактерий рода *Thiothrix* / Е.Ю. Черноусова [и др.] // Микробиология. – 2012. – Т. 81, № 3. С. 361-370.
18. Afshar S. Properties of a thermostable nitrate reductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum* / S. Afshar [et. al.] // J Bacteriol.– 2001. – V. 183, № 19. – P. 5491–5495.
19. Antipov A. N. Characterization of Molybdenum-Free Nitrate Reductase from Haloalkalophilic Bacterium *Halomonas* sp. Strain AGJ 1-3 / A. N. Antipov [et. al.] // Biochem (Moscow). – 2005. – V. 70, № 7. – P. 799–803.
20. Antipov A. N. Characterization of molybdenum-free nitrate reductase from haloalkalophilic bacterium *Halomonas* sp. strain AGJ 1-3 / A. N.

- Antipov [et. al.] // *Biochemistry (Mosc)*. – 2005. – V. 70, № 7. – P. 799–803.
21. Antipov A. N. Molybdenum-free nitrate reductases from vanadate-reducing bacteria / A. N. Antipov [et. al.] // *FEBS Lett*. – 1998. – V. 441, № 2. – P. 257–260.
22. Armbruster E. H. Improved technique for isolation and identification of *Sphaerotilus* / E.H. Armbruster // *Appl Microbiol*. – 1969. – V. 17. – P. 320–321.
23. Aruga S. Characterization of filamentous Eikelboom type 02IN bacteria and description of *Thiothrix disciformis* sp. nov. and *Thiothrix flexilis* sp. nov. / S. Aruga [et al.] // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2002. – V. 52. – P. 1309–1316.
24. Baker S. C. Cytochrome *cd1* structure: unusual haem environments in a nitrite reductase and analysis of factors contributing to beta-propeller folds / S. C. Baker [et. al.] // *J Mol Biol*. – 1997. – V. 269, № 3. – P. 440–455.
25. Bell L. C. Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductases in *Thiosphaera pantotropha*: the periplasmic enzyme catalyzes the first step in aerobic denitrification / L. C. Bell, D. J. Richardson, S. J. Ferguson // *FEBS Lett*. – 1990. – V. 265. – P. 85–87.
26. Berks B. C. Sequence analysis of subunits of the membrane bound nitrate reductase from a denitrifying bacterium: the integral membrane subunit provides a prototype for the dihaem electron-carrying arm of a redox loop / B. C. Berks [et. al.] // *Mol Microbiol*. – 1995. – V. 15. – P. 319–331.
27. Bertero M. G. Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductaseA / M. G. Bertero [et. al.] // *Nat Struct Biol*. – 2003. – V. 10, №9. – P. 681–687.
28. Blasco F. NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of *Escherichia coli* / F. Blasco [et. al.] // *Mol Microbiol*. – 1998. – V. 28, №3. – P. 435–447.

29. Blasco F. Nitrate reductase of *Escherichia coli*: completion of the nucleotide sequence of the nar operon and reassessment of the role of the alpha and beta subunits in iron binding and electron transfer / F. Blasco [et. al.] // Mol Gen Genet. – 1989. – V. 218. – P. 249–256.
30. Boogerd F. C. Dissimilatory nitrate uptake in *Paracoccus denitrificans* via a DmH1-dependent system and a nitrate-nitrite antiport system / F. C. Boogerd, H. W. van Verseveld, A. H. Stouthamer // Biochim Biophys Acta. – 1983. – V. 723. – P.415–427.
31. Borcharding H. Enzymatic microtiter plate-based nitrate detection in environmental and medical analysis / H. Borcharding [et. al.] // Anal Biochem. – 2000. – V. –282, № 1. – P. 1–9.
32. Braker G. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples / G. Braker, A. Fesefeldt, K.P. Witzel // Appl Environ Microbiol. – 1998. – V. 64, №10. – P. 3769–3775.
33. Braker G. Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples / G. Braker, J. M. Tiedje // Appl Environ Microbiol. – 2003. – V. 69, №6. – P. 3476–3483.
34. Breton J. Characterization of the paramagnetic iron-containing redox centres of *Thiosphaera pantotropha* periplasmic nitrate reductase / J. Breton [et. al.] // FEBS Lett. – 1994. – V. 345. – P. 76–80.
35. Cabello P. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea / P. Cabello, M. D. Roldan, C. Moreno-Vivian // Microbiol. – 2004. – V. 150. – P. 3527–3546.
36. Carlson C. A. Properties of dissimilatory nitrate reductase purified from the denitrifier *Pseudomonas aeruginosa* / C. A. Carlson, L. P. Ferguson, J. L. Ingraham // J Bacteriol. – 1982. – V. 151, №1. – P. 162–171.
37. Chernousova E. *Thiothrix caldifontis* sp. nov. and *Thiothrix lacustris* sp. nov., gammaproteobacteria isolated from sulfide springs / E. Chernousova [et al.] // Int J Syst Evol Microbiol. – 2009. – V. 59, Pt 12. – P. 3128–3135.

38. Cole J. A. Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria – short circuit in the biological nitrogen cycle / J. A. Cole, C. M. Brown // FEMS Microbiol Lett. – 1980. – V. 7. – P. 65–72.
39. Coppola D. Antarctic bacterial haemoglobin and its role in the protection against nitrogen reactive species / D. Coppola, D. Giordano, M. Tinajero-Trejo // Biochim. Biophys. Acta. – 2013. – V. 1834, - P.1923–1931.
40. Craske A. The respiratory nitrate reductase from *Paracoccus denitrificans*. Molecular characterisation and kinetic properties / A. Craske, S. J. Ferguson // Eur J Biochem.– 1986. – V. 158, № 2. – P. 429–436.
41. Dale J. Park S. Molecular genetics of bacteria / J. Dale, S. Park // Chichester, United Kingdom: Wiley and Sons. – 2010. – P. 293.
42. Dalsgaard T. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment / T. Dalsgaard, B. Thamdrup, D. E. Canfield // Res Microbiol. – 2005. – V. 156, №4. – P. 457–464.
43. Danneberg G. Energy transduction efficiencies in nitrogenous oxide respirations of *Azospirillum brasilense* Sp7 / G. Danneberg, W. Zimmer, H. Bothe // Arch Microbiol. – 1989. – V. 151. – P. 445–453.
44. Dannenberg S. Oxidation of H₂, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O₂ or nitrate by sulfate-reducing bacteria / S.Dannenberg // Arch Microbiol. – 1992. – V. 158. – P. 93–99.
45. Einsle O. Cytochrome c nitrite reductase from *Wolinella succinogenes* – structure at 1.6 angstrom resolution, inhibitor binding, and heme-packing motifs / O. Einsle [et. al.] // J Biol Chem. – 2000. – V. 275. – P. 39608–39616.
46. Einsle O. Mechanism of the six-electron reduction of nitrite to ammonia by cytochrome c nitrite reductase / O. Einsle [et. al.] // J Am Chem Soc. – 2002. – V. 124. – P. 11737–11745.
47. Einsle O. Structure of cytochrome c nitrite reductase / O. Einsle // Nature. – 1999. – V. 400. – P. 476–480.

48. Esnouf R. An extensively modified version of Mol Script that includes greatly enhanced coloring capabilities / R. Esnouf // J Mol Graph. – 1997. – V. 15. – P. 132–134.
49. Fairbanks J. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane / J. Fairbanks, T. K. Steek, D. F. Wallach // Biochemistry. –1971. – V. 10. – P. 2606–2617.
50. Favre-Bonte S. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells / S. Favre-Bonte, B. Joly, C. Forestier // Infect Immun. – 1999. –V. 67. – P. 554–561.
51. Ferry J.G. The stepwise evolution of early life driven by energy conservation / J.G. Ferry, C.H. House // Mol. Biol. Evol. – 2006. – V.23, P.1286–1292.
52. Filimonenkov A. A. Isolation and characterization of nitrate reductase from the halophilic sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio nitratireducens* / A. A. Filimonenkov [et. al.] // Biochemistry (Mosc). – 2010. – V. 75, № 6. – P. 744–751.
53. Forget P. Les nitrate-reductases bacteriennes: solubilisation, purification et proprietes de l'enzyme A de *Micrococcus denitrificans* / P. Forget // Eur J Biochem. 1971 – V. 18. – P. 442–450.
54. Fülöp V. The anatomy of a bifunctional enzyme: structural basis for reduction of oxygen to water and synthesis of nitric oxide by cytochrome *cd1* / V. Fülöp [et. al.] // Cell. – 1995. – V. 81, № 3. – P. 369–377.
55. Gamble T. N. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils / T. N. Gamble, M. R. Betlach, J. M. Tiedje // Appl Environ Microbiol. – 1977. – V. 33. – P. 926–939.
56. Gebruk A. V. Feeding specialization of bresiliid shrimps in the TAG site hydrothermal community / A. V. Gebruk, N. V. Pimenov, A. S. Savvichev // Mar Ecol Ser. – 1993. – V. 98. – P. 247–253.

57. Gillan D.C. Novel epibiotic *Thiothrix* bacterium on a marine amphipod / D. C. Gillan, N. Dubilier // Appl Environ Microbiol. – 2004. – V. 70. – P. 3772–3775.
58. Goh K.S. Study of the *gyrB* gene polymorphism as a tool to differentiate among *Mycobacterium tuberculosis* complex subspecies further underlines the older evolutionary age of '*Mycobacterium canettii*' / K.S. Goh [et. al.] // Mol Cell Probes. – 2006 – V.20.– P.182–190.
59. Goldflam M. Evidence for gene sharing in the nitrate reduction systems of *Pseudomonas aeruginosa* / M. Goldflam, J. J. Rowe // J Bacteriol. – 1983. –V. 155. – P. 1446–1449.
60. Grabovich M. Yu. Lithoheterotrophic growth and electron transfer chain components of the filamentous gliding bacterium *Leucothrix mucor* DSM 2157 during oxidation of sulfur compounds / M. Yu. Grabovich [et al.] // FEMS Microbiol Let. – 1999. – V. 178. – P. 155–161.
61. Gregory L.G. Characterization of a nitrate-respiring bacterial community using the nitrate reductase gene (*narG*) as a functional marker / L. G. Gregory [et. al.] // Microbiology (UK). – 2003. – V. 149. – P. 229–237.
62. Guigliarelli B. EPR and redox characterization of ironsulfur centers in nitrate reductases A and Z from *Escherichia coli*: evidence for a high-potential and a low-potential class and their relevance in the electron-transfer mechanism / B. Guigliarelli [et. al.] // Eur J Biochem. – 1992. – V. 207. – P. 61–68.
63. Hartig E. Nitrate and nitrite control of respiratory nitrate reduction in denitrifying *Pseudomonas stutzeri* by a two-component regulatory system homologous to NarXL of *Escherichia coli* / E. Hartig [et. al.] // J Bacteriol. – 1999. – V. 181, №2. – P. 3658–3665.
64. Hensen D. Thiosulphate oxidation in the phototrophic sulphur bacterium *Allochromatium vinosum* / D. Hensen [et. al.] // Mol Microbiol. – 2006. – V. 62, № 3. – P. 794–810.

65. Hernandez D. Oxygen inhibition of nitrate uptake is a general regulatory mechanism in nitrate respiration / D. Hernandez, J. J. Rowe. // *J Biol Chem.* – 1988. – V. 263. – P. 7937–7939.
66. Hettmann T. *Pseudomonas stutzeri* soluble nitrate reductase alphabeta-subunit is a soluble enzyme with a similar electronic structure at the active site as the inner membrane-bound alpha-beta-gamma holoenzyme / T. Hettmann [et. al.] // *FEBS Lett.* – 2003. – V. 534, №1-3. – P. 143–150.
67. Hochstein L. I. Purification and properties of a dissimilatory nitrate reductase from *Haloferax denitrificans* / L. I. Hochstein, F. Lang // *Arch Biochem Biophys.* – 1991. – V. – 288, № 2. – P. 380–385.
68. Hochstein L. I. The enzymes associated with denitrification / L. I. Hochstein, G. A. Tomlinson // *Annu Rev Microbiol.* – 1988. – V. 42. – P. 231–261.
69. Hoffmann T. The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system / T. Hoffmann [et. al.] // *FEMS Microbiol Lett.* – 1995. – V. 131, №2. – P. 219–225.
70. Hofmann M. Density functional theory studies of model complexes for molybdenum-dependent nitrate reductase active sites / M. Hofmann // *J Biol Inorg Chem.* – 2007. – V. 12. – P. 989–1001.
71. Fossing H. Concentration and transport of nitrate by the mat-forming sulphur bacterium *Thioploca* / H. Fossing [et al.] // *Nature.* – 1995. – V. 374. – P. 713–715.
72. Howarth R. 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. / R. Howarth [et al.] // *Int J Syst Bacteriol.* – 1999. – V. 49. – P. 1817–1827.

73. Jacq E. G. Microscopic examination and fatty acid characterization of filamentous bacteria colonizing substrata around subtidal hydrothermal vents / E.G. Jacq [et al.] // Arch. Microbiol. – 1989. – V. 152. – P. 64–71.
74. Jannasch H. W. Recent progress in the microbiology of hydrothermal vents / H. W. Jannasch, D. C. Nelson // Current perspectives in microbiol. Ecology / American society for microbiology. – Washington D. C. – 1984. – P. 170–176.
75. Jetten M. S. M. 1994–2004: 10 years of research on the anaerobic oxidation of ammonium / M. S. M. Jetten [et. al.] // Biochem Soc Trans. – 2005. – V. 33. – P. 119–123.
76. Jetten M. S. M. Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria / M. S. Jetten [et. al.] // Crit Rev Biochem Mol Biol. – 2009. – V. 44. – P. 65–84.
77. Jormakka M. Architecture of NarGH reveals a structural classification of Mo-bisMGD enzymes / M. Jormakka [et. al.] // Structure. – 2004. – V. 12, №1. – P. 95–104.
78. Kanagawa T. Phylogenetic analysis of and oligonucleotide probe development for Eikelboom type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge / T. Kanagawa [et al.] // Appl Environ Microbiol. – 2000. – V. 66, №11. – P. 5043–5052.
79. Kartal B. Candidatus '*Brocadia fulgida*': an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium / B. Kartal [et. al.] // FEMS Microbiol Ecol. – 2008. – V. 63, №1. – P. 46–55.
80. Kartal B. Candidatus "*Anammoxoglobus propionicus*" a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria / B. Kartal [et. al.] // Syst Appl Microbiol. – 2007. – V. 30, №1. – P. 39–49.
81. Kern M. Variants of the tetrahaem cytochrome *c* quinol dehydrogenase NrfH characterize the menaquinol-binding site, the haem *c*-binding motifs and the transmembrane segment / M. Kern, O. Einsle, J. Simon // Biochem J. – 2008. – V. 414, №1. – P. 73–79.

82. Ketchum P. A. Purification of Two Nitrate Reductases from *Xanthomonas maltophilia* Grown in Aerobic Cultures / P. A. Ketchum, W. J. Payne // *Appl Environ Microbiol.* – 1992. – V. 58, № 11. – P. 3586–3592.
83. Kroneck P.M. Molybdenum in nitrate reductase and nitrite oxidoreductase / P. M. Kroneck, D. J. Abt // *Met Ions Biol Syst.* – 2002. – V. 39. – P. 369–403.
84. Kuenen J. G. Extra ordinary anaerobic ammonium oxidizing bacteria / J. G. Kuenen, M. S. M. Jetten // *ASM News.* – 2001. – V. 67. – P. 456–463.
85. Kumar M. Co-existence of anammox and denitrification for simultaneous nitrogen and carbon removal – strategies and issues / M. Kumar, J.-G. Lin // *J Hazard Mater.* – 2010. – V. 178. – P. 1–9.
86. Kuypers M. M. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea / M. M. Kuypers [et. al.] // *Nature.* – 2003. – V. 422, №6932. – P. 608–611.
87. La Croix L. B. Electronic structure of the perturbed blue copper site in nitrite reductase: spectroscopic properties, bonding, and implications for the entatic/rack state / L. B. La Croix [et. al.] // *J Am Chem Soc.* – 1996. – V. 118. – P. 7755–7768.
88. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – V. 227. – P. 680–685.
89. Lanciano P. Biogenesis of a respiratory complex is orchestrated by a single accessory protein / P. Lanciano [et. al.] // *J Biol Chem.* – 2007. – V. 282, №24. – P. 17468–17474.
90. Larkin J. M. Characterization of *Thiothrix nivea* / J. M. Larkin, D. L. Shinabarger // *Int J Syst Bacteriol.* – 1983. – V. 33. – P. 841–846.
91. Larkin J. M. Genus II. *Thiothrix* Winogradsky 1888 / J. M. Larkin // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* – Baltimore. – 1989. – V. 3. – P. 2098–2101.

90. Larkin J. M. Occurrence of *Thiothrix* sp. attached to Mayfly larva and presence of a parasitic bacteria in the *Thiothrix* sp. / J. M. Larkin, M. C. Henk, S. D. Burton // Appl. Environ. Microbiol. – 1990. – Vol.56. – P. 357 – 361.
92. Lin J. T. Nitrate assimilation by bacteria / J. T. Lin, V. Stewart // Adv Microb Physiol. – 1998. – V. 39. – P. 1–30.
93. Lin J. T. Structures of genes *nasA* and *nasB*, encoding assimilatory nitrate and nitrite reductases in *Klebsiella pneumoniae* M5a1 / J. T. Lin, B. S. Goldman, V. Stewart // J Bacteriol. – 1993. – V. 175. – P. 2370–2378.
94. Lin J. T. The *nas FEDCBA* operon for nitrate and nitrite assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. / J. T. Lin, B. S. Goldman, V. Stewart // J Bacteriol. – 1994. – V. 176. – P. 2551–2559.
95. Lledó B. Respiratory nitrate reductase from haloarchaeon *Haloferax mediterranei*: biochemical and genetic analysis / B. Lledó [et. al.] // Biochim Biophys Acta. – 2004. – V. 1674, № 1. – P. 50–59.
96. Marger M. D. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport / M. D. Marger, M.H. Saier // Trends Biochem Sci. – 1993. – V. 18, №1. – P. 13–20.
97. Marietou A. Preferential reduction of the thermodynamically less favorable electron acceptor, sulfate, by a nitrate-reducing strain of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* 27774 / A. Marietou, L. Griffiths, J. Cole // J Bacteriol. – 2009. – V. 191, № 3. – P. 882–889.
98. Martinez-Espinosa R. M. Look on the positive side! The orientation, identification and bioenergetics of 'Archaeal' membrane-bound nitrate reductases / R. M. Martinez-Espinosa [et. al.] // FEMS Microbiol Lett. – 2007. – V. 276, №2. P. 129–139.
99. Martinez-Espinosa R. M. Respiratory nitrate and nitrite pathway in the denitrifier haloarchaeon *Haloferax mediterranei* / R. M. Martinez-

- Espinosa [et. al.] // Biochem Soc Trans. – 2006. – V. 34, № 1. – P. 115–117.
100. Mc Donald D.W. Properties of assimilatory nitrate reductase from *Aspergillus nidulans* / D.W. Mc Donald, A. Coddington // Eur J Biochem. – 1974. – V. 46. – P. 169–178.
 101. Mc Hatton S. C. High nitrate concentrations in vacuolate, autotrophic marine *Beggiatoa* spp. / S. C. Mc Hatton [et al.] // Appl Environ Microbiol. – 1996. – V. 62. – P. 954–958.
 102. Milner G.L. Determination of nitrogen in biological materials / G. L. Milner, E. E. Miller // Anal Chem. – 1948. – V. 20. – P. 481.
 103. Morozkina E. V. Dissimilatory Nitrate Reduction in Fungi under Conditions of Hypoxia and Anoxia: A Review / E. V. Morozkina, A. V. Kurakov // Prikl Biokhim Mikrobiol. – 2007. – V. 43, № 5. P. 544–549.
 104. Morris H.E Quantitative determination of elemental sulfur in aromatic hydrocarbons / H. E. Morris, R. F. Lacombe, W. H. Lane // Anal Chem. – 1948. – V. 20. – P. 1037– 1039.
 105. Moura I. Structural aspects of denitrifying enzymes / I. Moura, J. J. Moura // Curr Opin Chem Biol. – 2001. – V. 5, № 2. – P. 168– 175.
 106. Nojiri M. Structure and function of a hexameric copper-containing nitrite reductase / M. Nojiri [et. al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2007. – V. 104, №11. – P. 4315–4320.
 107. Odintsova E.V. Chemolithoautotrophic growth of *Thiothrix ramosa* / E. V. Odintsova, A. P. Wood, D. P. Kelly // Arch Microbiol. – 1993. – V. 160. – P. 152–157.
 108. Palmer K. Genome-derived criteria for assigning environmental *narG* and *nosZ* sequences to operational taxonomic units of nitrate reducers / K. Palmer, H. L. Drake, M. A. Horn // Appl Environ Microbiol. – 2009. – V. 75. – P. 5170–5174.

109. Peck H.D. Studies of adenosine-5'-phosphosulfate reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* and *Thiobacillus denitrificans* / H. D. Peck, T. E. Deacon // J Biochem. – 1968. – V. 97. – P. 651–657.
110. Penton C. R. Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments / C. R. Penton, A. H. Devol, J. M. Tiedje // Appl Environ Microbiol. – 2006. – V. 72, №10. – P. 6829–6832.
111. Pfennig N. D. Über das vitamin B12 – bedurfuis phototropher Schwefelbakterien / N. D. Pfennig, K. D. Lippert // ArchMicrobiol. – 1966. – V. 55, № 1. – P. 245–256.
112. Philippot L. Characterization and transcriptional analysis of *Pseudomonas fluorescens* denitrifying clusters containing the *nar*, *nir*, *nor* and *nos* genes / L. Philippot [et. al.] // Biochim Biophys Acta. – 2001. – V. 1517, №3. – P. 436–440.
113. Philippot L. Purification of the dissimilative nitrate reductase of *Pseudomonas fluorescens* and the cloning and sequencing of its corresponding genes / L. Philippot [et. al.] // Biochim Biophys Acta. – 1997. – V. 1350, №3. – P. 272– 276.
114. Quan Z. X. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor / Z. X. Quan [et. al.] // Environ Microbiol. – 2008. – V. 10, №11. – P. 3130–3139.
115. Rich J. J. Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils / J. J.Rich [et. al.] // Appl Environ Microbiol. –2003. – V. 69. – P. 5974–5982.
116. Richardson D.J. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases / D. J. Richardson [et. al.] // Cell Mol Life Sci. – 2001. – V. 58, № 2. – P. 165–178.
117. Rodrigues M. L. X-ray structure of the membrane-bound cytochrome *c* quinol dehydrogenase NrfH reveals novel haem coordination / M. L. Rodrigues [et. al.] // EMBO J. – 2006. – V. 25. – P. 5951–5960.

118. Rossetti S. Phylogenetic and physiological characterization of a heterotrophic, chemolithoautotrophic *Thiothrix* strain isolated from activated sludge / S. Rossetti [et. al.] // Int J Syst Evol Microbiol. – 2003. – V. 53. – P. 1271–1276.
119. Rubio L. M. A cyanobacterial *narB* gene encodes a ferredoxin-dependent nitrate reductase / L. M. Rubio, A. Herrero, E. Flores // Plant Mol Biol. – 1996. – V. 30. – P.845–850.
120. Scala D. J. Diversity of nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in continental shelf sediments / D. J. Scala, L. J. Kerkhof // Appl Environ Microbiol. – 1999. – V. 65. – P. 1681–1687.
121. Schmid M. C. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity / M. C. Schmid [et. al.] // Environ Microbiol. – 2007. – V. 9, №6. – P. 1476–1484.
122. Schmid M. Candidatus "*Scalindua brodae*", sp. nov., Candidatus "*Scalindua wagneri*", sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria / M. Schmid [et. al.] // Syst Appl Microbiol. – 2003. – V. 26, №4. – P. 529–538.
123. Schmid M. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation / M. Schmid [et. al.] // Syst Appl Microbiol. – 2000. – V. 23. – P. 93–106.
124. Schulz H. N. (2006) The genus *Thiomargarita*. The Prokaryotes (Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH & Stackebrandt E, eds.) / H. N. Schulz // Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. – 2006. – V. 6. – P. 1156–1163.
125. Sias S. R. The assimilatory and dissimilatory nitrate reductases of *Pseudomonas aeruginosa* are encoded by different genes / S. R. Sias, A. H. Stouthamer, J. L. Ingraham // J Gen Microbiol. – 1980. – V. 118. – P. 229–234.

126. Silver W. L. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in upland tropical forest soils / W. L. Silver, D. J. Herman, M. K. Firestone // *Ecology*. – 2001. – V. 82. – P. 2410–2416.
127. Simon J. Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification / J. Simon // *FEMS Microbiol Rev.* – 2002. – V. 26, № 3. – P. 285–309.
128. Simon J. The tetraheme cytochrome *c* NrfH is required to anchor the cytochrome *c* nitrite reductase (NrfA) in the membrane of *Wolinella succinogenes* / J. Simon [et. al.] // *Eur J Biochem.* – 2001. – V. 268, №22. – P. 5776–5782.
129. Smith C. J. Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments / C. J. Smith [et. al.] // *Appl and Environ Microbiol.* – 2007. – V. 73. – P. 3612–3622.
130. Spiro S. Regulators of bacterial responses to nitric oxide / S.Spiro // *FEMS Microbiol Rev.* – 2007. – V. 31, № 2. – P. 193–211.
131. Stein J. L. Subtidal gastropods consume sulfur-oxidizing bacteria: evidence from coastal hydrothermal vents / J. L. Stein // *Science.* – 1984. - V. 223. - P. 696-698.
132. Stolz J.F. Evolution of nitrate reductase: molecular and structural variations on a common function / J. F. Stolz, P. Basu // *Chembiochem.* – 2002. – V. 3. – P. 198–206.
133. Strous M. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome / M. Strous [et. al.] // *Nature.* – 2006. – V. 440, № 7085. – P. 790–794.
134. Strous M. Missing lithotroph identified as new planctomycete / M. Strous [et. al.] // *Nature.* – 1999. – V. 400, №6743. – P. 446–449.
135. Takaya N. Dissimilatory nitrate reduction metabolism and their control in fungi / N. Takaya // *J Biosci Bioeng.* – 2002. – V.94, №6. – P. 506–510.

136. Tamura K. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K. Tamura [et. al.] // *Mol Biol Evol.* – 2011. – V. 28. – P. 2731–2739.
137. Teske A. The genera *Beggiatoa* and *Thioploca*. The Prokaryotes (Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH and Stackebrandt E, eds) / A. Teske, D.C. Nelson // Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. – 2006. – V. 6. – P. 784–810.
138. Thompson J. D. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice / J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson // *Nucl Acids Res.* – 1994. – V. 22. – P. 4673–4680.
139. Tosques I. E. Characterization and regulation of the gene encoding nitrite reductase in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 / I. E. Tosques [et. al.] // *J Bacteriol.* – 1997. – V. 179, № 4. – P. 1090–1095.
140. Uden G. O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria / G. Uden [et. al.] // *Arch Microbiol.* – 1995. – V. 164, №2. – P. 81–90.
141. Unz R. F. Genus *Thiothrix* Winogradsky 1888 / R. F. Unz, I. M. Head // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* – 2004. – V. 2. – P. 1–10.
142. Unz R.F., Head I.M. Genus I. *Thiothrix* Winogradsky 1888, 39AL. // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. / Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity. New York: Springer, 2005. V. 2. Part B. P. 131–142.].
143. Vairinhos F. Simultaneous assimilation and denitrification of nitrate by *Bradyrhizobium japonicum* / F. Vairinhos, W. Wallace, D. J. D. Nicholas. // *J Gen Microbiol.* – 1989. – V. 135. – P. 189–193.
144. Van de Vossenberg J. Enrichment and characterization of marine anammox bacteria associated with global nitrogen gas production / J. van de

- Vossenbergh [et. al.] // Environ Microbiol. 2008 – V. 10, №11. – P. 3120–3129.
145. Wagner M. Identification and in situ detection of Gram-negative filamentous bacteria in activated sludge / M. Wagner [et al.] // Syst Appl Microbiol. – 1994. – V. 17. – P. 405–417.
146. Wang L.T. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group / Wang L.T., Lee F.L., Tai C.J., Kasai H. // Int J Syst Evol Microbiol. – 2007. V. 57, P.1846–1850.
147. Warnecke-Eberz U. Three nitrate reductase activities in *Alcaligenes eutrophus* / U. Warnecke-Eberz, B. Friedrich // Arch Microbiol. – 1993. – V. 159, P. 405–409.
148. Wientjes F. B. Respiratory nitrate reductase: its localization in the cytoplasmic membrane of *Klebsiella aerogenes* and *Bacillus licheniformis* / F. B. Wientjes [et. al.] // Eur J Biochem. – 1979. – V. 95. – P. 61–67.
149. Williams T. M. Isolation and characterization of filamentous bacteria present in bulking activated-sludge / T. M. Williams, R. F. Unz // Appl Microbiol Biotechnol – 1985. – V.22. – P. 273–282.
150. Winogradsky S. Beiträge zur Morphologic und Physiologic der Bakterium / S. Winogradsky // Heft 1. Zur Morphologic und Physiologic der Schwefelbakterien. – Leipzig. – 1888. – S. 1–120.
151. Woebken D. A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus Scalindua* phylotype in marine oxygen minimum zones / D. Woebken [et. al.] // Environ Microbiol. – 2008. – V. 10, №11. – P. 3106–3119.
152. Yoshimatsu K. Purification and characterization of dissimilatory nitrate reductase from a denitrifying halophilic archaeon, *Haloarcula marismortui* / K. Yoshimatsu, T. Sakurai, T. Fujiwara // FEBS Lett. – 2000. – V. 470, №2. – P. 216–220.

153. Yoshimatsu K. Sequence and electron paramagnetic resonance analyses of nitrate reductase NarGH from a denitrifying halophilic euryarchaeote *Haloarcula marismortui* / K. Yoshimatsu, T. Iwasaki, T. Fujiwara // FEBS Lett. – 2002. – V. 516, №1-3. – P. 145–150.
154. Zumft W. G. Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type / W. G. Zumft // J Inorg Biochem. – 2005. – V. 99, №1. –P. 194–215.
155. Zumft W.G. Cell biology and molecular basis of denitrification / W. G. Zumft // Microbiol Mol Biol Rev. – 1997. – V. 61, № 4. – P. 533–616.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Нуклеотидные последовательности фрагментов генов:

narG

T. caldifontis G1^T (JX267821.1)

gcgtttgggctggattggtcacgtccgccacggcaaatgaatggcacgctcgttcttctacaaccattccagccaat
ggcgttacgaaaagctcgaaatcaaggaaatcctttccccgctggcgaacaaagcgctcaatccggcaacttgat
tgactacaacgtgcgggcagaacgcatgggctggttgccctccgcgcccgaactcaataccaaccggttacgcatt
gctcaagctgcsaaagacgcaggcatgagtcggcgattacaccggttgccagcctcaaatccggcaagatcgct
ttgcggcggaagacccccgataacgcgcaaaacttcccacgtaacctgttcgtgtggcggtccaatttgctgggttc
gtccggcгааaggcatgaatacttgctcaagtatttgctggggacaaagcatggcggtgcaaggcaaagacctcggc
gaaatgggcggggtgaaaccgcaagaagtgaagtggcatcaagacgcgcccgaaggcaaactcgacttgctggtga
cgctcgatttccgcatgtctaccacctgcttgattccgacatcgtgctaccgaccgacgactggtac

T. caldifontis G3 (KF926097.1)

gcgtttgggctggattggtcacgtccaccacggcaaatgaatggcacgctcgttcttctacaaccattccagccaat
ggcgttacgaaaagctcgaaatcaaggaaatcctttccccgctggcgaacaaagagcgctcaatccggcaacttgat
tgactacaacgtgcgggcagaacgcatgggctggttgccctccgcaccccagctcaatatcaaccggttacgcatt
gccaaggcagccaaagacgcgggcatgagtcggcgattacaccggttgatgcgttaaatccggcaaaatcgct
ttgccgctgaagatcccgataatgcgcaaaatttcccgcgcaacctgttcgtgtggcggtccaatttgctgggttc
gtccggcгааaggcatgaatacttgctcaagtatttgctggggacaaaacacggcggtgcaaggcaaagaccttggt
gaaatgggcggagtgaaaccgcaagaagtgaagtggcatacagatgcgcccgaaggcaaactcgatttgctggtgaa
cactcgacttccgcatgtccaccacctgcttgattccgacatcgtgctaccgaccgacgactggtac

T. eikelboomii AP3^T (JX267822.2)

gcgtttgggctggactggtcacgtccgccacggcaaatgaatggcacgctcgttcttctacaaccattccagccaat
ggcgttacgaaaagctcgaaatcaaggaaatcctttccccgctggcgaacaaagagcgctcaatccggtaacttgat
tgactacaacgtgcgggcagaacgcatgggctggttgccctccgcgcccgaactcaataccaaccggttacgtatt
gccaaggcagccaaagacgcgggcatgagtcggcgattacaccggttgccagcctcaaatccggcaagatcgct
ttgcagcggaagacccccgacaacgcgcaaaacttcccgcgcaatctgttcgtgtggcgctccaatttgctgggttc
ttcgggcгааaggcatgaatacttgctcaagtatttgctggggacaaagcacgggtgtgcaaggcaaagatctcggc
gaaatgggcggagtgaaaccgcaagaagtgaagtggcatacagatgcgcccgaaggcaaactcgatttgctggtgaa
cgctcgatttccgcatgtccaccacctgcttgattccgacatcgtgc

T. unzii A1^T (JX267823.1)

gcgtttgggctggactggtcacgtccgccacggcaaatgaatggcacgctcgttcttctacaaccattccagccaat
ggcgttacgaaaagctcgaaatcaaggaaatcctttccccactggcgaacaaagcgctcaatccggcaacttgat
tgactacaacgtgcgggcagaacgcatgggctggttgccctccgcaccccagctcaataccaaccggttgccatt
gccccagccgccaagacgcaggcatgagcccggcgattacaccggttgccagcctcaaatccggcaagatcgct
ttgcggcggaagacccccgacaacgcgcaaaacttcccgcgcaacctgttcgtgtggcggtccaatttgctgggttc
ttcgggcгааaggcatgaatacttgctcaagtatttgctgggtacaaagcacggcggtgcaaggcaaagacctcggc
gaaatgggcgcgctgaaaccgcaagaagtgaagtggcatacagatgcgcccgaaggcaaactcgatttgctggtgaa
cactcgacttccgcatgtccaccacctgcttgattccgacatcgtgctaccaaccgcaactgg

T. unzii TN (KF039721.1)

cgacaaatgaatggcacgcttgttcttctacaaccattccagccaatggcgttatgaaaagctggaaatcaaggaa
tcctttccccgctggcgaacaaagcgctcaatccggcaacttgattgactacaacgtgcgggcagaacgcatggg
ctggttgccatctgcgccgagttgaatactaatccggttgccattgcccagccgcgaaagatgcgggcatgagt
ccggcgattacaccggttgccagcctcaaatccggcaagatcgctttgcggcggaagacccccgataacgcgcaaa
acttcccgcgtaacctgttcgtgtggcggttccaatttgctgggttcacccggcaagggtgatgaatacttgctcaa
gtatttgctggggacaaagcacggcggtgcaaggcaaagacctcggcgaatgggcggggtgaaaccgcaagaagta
aagtggcatacagacgcaccccgaaggcaaaactcgatttgctggtgacgctcgatttccgcatgtccaccac

T. lacustris BL^T (JX267824.1)

gccttcggtctggactggagccgccaccgctcaaatgaacggtacatccttcttctacaaccactccaaccagt
ggcgttacgagaagctggaaatcaaggaaattctctcgccgctagccgaccgccaataccccggcagcctgat
cgactacaacgtgcgggcagaacgcatgggttggtgccttcagcaccgagctcaacaccaaccgctacgcatt
gccaaggccgccaaggatgcaggcatgtccccggcggattacaccgtagccagcctcaaatccggcaaaattgct
ttgcggcagaagaccggattccccgcaaaacttccccgcgaacctgtttgtgtggcggtccaacttgctgggttc
ctccggcaagggcatgaatacctactcaaatatcttactgggaaccaagcacggcgtgcaaggcaaaccttggc
gaaatggcgcgcaaaaaccgaggaagtgaatggcggaagaatgcaggaaggcaagctcgacttgctggtga
cgctcgacttccgtatgtccaccactgtttgtattccgacatcgactgcctaccgagcatgg

T. lacustris AS (JX267825.1)

gaaaagctgctccgcaaccgggctggttgcctttggccttcggtctggactggagccgccaccgctcaaatga
acggcacatccttcttctacaaccactccaaccagtggcggttacgagaagctggaaatcaaggaaattctctcgcc
gctagccgaccctgcaaaataccccggcagcctgatcgactacaacgtgcgggcagaacgcatgggtggttgcct
tcagcaccgagctcaataccaaccgctgcgcatgtgcaaggccgccaaggatgctggcatgtccccggcggatt
acaccgtggccagcctcaaatccggcaagatcgcggttgcggcagaagaccggattccccgcaaaatctccgcg
caacctgtttgtgtggcggttccaacttgctgggttctccggcaaggggcatgaatacctactcaaatatcttactg
ggaaccaagcacggcgtgcaaggcaaaccttggcgaaatggcgggcgcaaaaaccgaggaagtgaatggcggtg
aagaaatgcaggaaggcaagctcgacttgctggtgacgctcgacttccgta

nirs

T. lacustris AS (KC855765.1)

gcaattgtgtctaccgctggcatggtggttggtacgcaagagtatcaccagaaccgctgtggcagcgattgtgg
cttcgcatgaacaccctgagttcatcgtcaacgtcaaggaaaccggcaaggtgttgcctggtcaattacgaagatgt
ggataacctgagtggtaccaccattccagcagcaccttctctgcatgatggcggttgggatgccaccaccggttac
ttctgacggctgccaatcagtcggacaaggtggcagtcattgactctaaagaacgcaagctgactgctttgattg
atgtcgataaaattccgcatccggggcgtggcgaaacttcatcaccacaagtttgcccagtggtgggcaaccag
cgccttgggtaacgaaaaaattaccctgatcggcactgaccctgaaggtcataaagataatgcctggaaagtgggtg
gaaacctcaaggggcaggggtggttcaactctcatcaagacgcacccaaaatccaccaacctgtgggtcgata
ctggcttgaaccggatgaaaagctcagccagtcctggcagtggttgacatcaagaatctcgagaagggatacga
ggttctgccgatcgccgaatgggtgatctggcgaaagcccaaacgtgtggtgagcctgaatacaacaaggcg
ggcgatgaagtctggctttccgtatggaatggcaaaaaccagaaatctgccttggctggtgattgatgacaagacc
gtcagttgaagaaggttatc
aagggacgag cgtctgatta cccac

T. unzii A1^T (KC855767.1)

tacgaagacattgataacctgagtgtagaccaccattcctgcccgccttctctgcatgacggcggctgggatgcg
actcaccggtatttctgacagcggcgaatcagtcgacaaggtagccgttatcgactcgaaagagcgcaaacctc
tcggcactgattgacgtggataaaattccacatccgggacgtggcgcaatttactcacccaaatcagccct
gtctgggcaaccagtgcttgggtaataaaaaatcaccttgatcggcactgatcccgaaggccacaaagacaat
gcatggaaagtggctgaaaccctcaaagg

T. caldifontis G1^T (KC855768.1)

tacgaagacattgataacctgagtgtagaccaccattcctgcccgccttctctgcatgaggggttgggatgcg
accacaccggtatttctgacagcggcgaatcagtcgacaaggtagccgttatcgactcgaaagagcgcaaacctc
tcggcactgattgacgtggataaaattccacatccgggacgtggcgcaaatctcgttacccaaatcagccctg
tctgggcaaccagtgcttgggcaatgaaaaatcaccttgatcggcactgatcccgaaggccataaagacaatg
cgtggaaagttgtcgaaacccttaaaggtaagggtggcggttactctt catcaagacgcacca

T. caldifontis G3 (KF926096.1)

tacgaagacattgataacctgagtgaccaccatttctgcccgccttctgcatgatggcgggtgggatgc
gaccacccgttattttctgacagcggcgaatcagtcgacaaggtagccgttatcgactcgaagagcgcaaac
tctcggcactgattgacgtggataaaattccacatccgggacgcggcgaatttcgttaccctaaatacggc
cccgtctgggcaaccagtgcggtgggcaatgaaaaatcaccttgatcggcactgatcccgacggtcacaaaga
caatgctggaaagtggtcgaaaccctcaaa

cnorB*T. unzii* TN (KF977407.1)

attaccggcattatcgggtacagggcatcacttttactggattggtgcccgggatactggcaatgggtgggggt
cgattttctcggcacttgaaccgattccggttcttcattatgacgctgtttgccttcaatgtgatcaataaacg
taagcgcgaacaccccaacaaagcagccgtgttggtgggcaatgggtacggcgggtattggcgtttttgggtgcg
ggcgtctggggcttca

T. lacustris AS (KF926095.1)

gaccgcgaagtgattgaaaaatggttgatgtgatcattgcatggcgtgattactggcatcattggtacag
gacatcacttttactggattggtgcccgggtactggcaatgggtgggggtcgatcttctcggcactggaacc
gatcccgttcttcatcatgacgctatttgcttcaatgtgatcaacaagcgaagcgtgaacaccccaacaaag
gcccgcgtgttggtgggcaatggggacagccgtactggcatttctggggggcggcgtctggg gcttcacg

T. caldifontis G3 (KJ419278.1)

tgattaccggcattatcgggtacagggcatcacttttactggattggtgcccgggatactgccaatggcgggg
gtcgattttctcggcccttgaaccgattccggtcttcattatgacgctgtttgccttcgatgtgatcaataag
cgcaagcgcgaacaccccaacaaagcagcagcgttggtgggcaatggggacggcgggtattggcat
tcctaggcgcagg

T. unzii A1^T (KJ748493.1)

attactggcatcatcgggtacagggcatcacttttactggattggtgcccgggatactggcaatgggtgggggtc
Gattttctcggcacttgaaccgattccggttcttcattatgacgctgtttgccttcaatgtgatcaataaacgta
agcgcgaacaccccaacaaagcagccgtgttggtgggcaatgggtacagccgtactg

T. caldifontis G1^T (KJ748494.1)

attactggcatcatcgggtacagggcatcacttttactggattggtgcccgggatactggcaatgggtgggggt
Cgattttctcagcactggaaccgattccggttttcatcatgaccctgtttgccttcaatgtgatcaataagcg
caagcgcgaacaccccaacaaagcagcagcgtgttggtgggcaatgggtacagccgtactg