

*На правах рукописи*



**Трубицин Иван Васильевич**

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

03.01.04 Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Воронеж – 2014

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО  
«Воронежский государственный университет»

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, доцент  
**Грабович Маргарита Юрьевна**

**Официальные  
оппоненты:**

**Хайлова Людмила Самуиловна**  
Доктор биологических наук, старший  
научный сотрудник, Московский  
государственный университет им.  
М.В.Ломоносова; Научно-  
исследовательский институт физико-  
химической биологии им. А.Н.  
Белозерского, старший научный сотрудник

**Рогожин Евгений Александрович**  
кандидат химических наук, ФГБУН  
Институт биоорганической химии им.  
академиков М.М. Шемякина и Ю.А.  
Овчинникова РАН, младший научный  
сотрудник.

**Ведущая организация:**

ФГБУН Институт биохимии и физиологии  
растений и микроорганизмов РАН

Защита диссертации состоится «25» декабря 2014 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета Д.212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394006 г. Воронеж, Университетская пл. 1., комната 59. С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета и на сайте <http://www.science.vsu.ru>

Автореферат разослан «    » \_    \_ 2014 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Грабович Маргарита Юрьевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 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 Hatton *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 Hatton *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  $\alpha$ -субъединицу респираторной нитратредуктазы, у представителей рода *Thiothrix* и оценить уровень его экспрессии в различных условиях культивирования.
3. Выделить респираторную нитратредуктазу в электрофоретически гомогенном состоянии из *T. lacustris* AS, изучить физико-химические свойства и кинетические характеристики этого фермента.
4. У представителей серобактерий рода *Thiothrix* (*T. lacustris* BL<sup>T</sup>, AS; *T. caldifontis* G1<sup>T</sup>, G3; *T. unzii* A1<sup>T</sup>, TN; *T. eikelboomii* AP3<sup>T</sup>; *T. nivea* JP2<sup>T</sup>) 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 – редуктазы, и *nosZ*, кодирующего N<sub>2</sub>O – редуктазу.
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 N<sub>2</sub> *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  $\alpha$ -субъединицы респираторной нитратредуктазы NarGH<sub>I</sub>. 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 *cnorB* 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 Пушкинская 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), 5<sup>th</sup> FEMS Congress of European Microbiologists (Leipzig, Germany, 2013).

**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.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объектами исследования** служили 9 представителей 2 групп бактерий рода *Thiothrix*: представители группы «*T. nivea*» (*T. nivea* JP2<sup>T</sup> DSM 5205, *T. lacustris* BL<sup>T</sup> DSM 21227, *Thiothrix lacustris* AS “UNIQEM” 905, *T. caldifontis* G1<sup>T</sup> DSM 21228, *T. caldifontis* G3 “UNIQEM” 981, *T. unzii* A1<sup>T</sup> ATCC 49747, *T. unzii* TN “UNIQEM” 959), и группы «Eikelboom type 021N» (*T. flexilis* EJ2M-B<sup>T</sup> DSM 14609 и *T. eikelboomii* AP3<sup>T</sup> ATCC 49788).

**Состав сред и условия культивирования.** Для культивирования бактерий использовали среду Амбрустера (Armbruster, 1969) с модификациями. 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<sub>3</sub>; 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).

**Выделение геномной ДНК** представителей рода *Thiothrix* производили при помощи набора Genomic DNA Purification Kit (Fermentas) согласно протоколу производителя. Качество выделенной геномной ДНК определяли электрофоретически в 0,8 % агарозном геле с бромистым этидием (1 %).

**Реакцию обратной транскрипции** проводили в соответствии с протоколом фирмы изготовителя (Fermentas, Литва).

**ПЦР амплификацию ДНК** проводили в смесях для ПЦР с добавлением матрицы ДНК (0,25 мкг/мл) и олигонуклеотидов (5 мкМ каждый). ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе ДТ-322 (ДНК-Технология) с использованием интеркалирующего в двуцепочечную ДНК флуоресцентного красителя Sybr Green I.

**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.

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

**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 *cnorB*, 150 бактериальных и архейных изолятов, которые были получены из базы данных FGPR. Деревья были построены в программе MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011).

**Анализ анионов.** Концентрацию нитрита определяли модифицированным методом Грисса–Илосвая (Уильямс, 1982), с использованием в качестве красителя нафтилэтилендиамин ацетата, концентрацию нитрата – методом титрования хромотроповой кислотой в присутствии H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Уильямс, 1982) и с помощью нитратомера ИТ-1201 ООО «Измерительная техника» (Россия). Ионы аммония определяли с реактивом Несслера при длине волны 400 нм (Milner and Miller, 1948) на спектрофотометре UV-1650

РС (Shimadzu, Япония). Молекулярный азот определяли на газовом хроматографе Хроматек Кристалл 5000.1 (Россия).

**Для определения активности нитратредуктазы** использовали следующую реакционную смесь: 0,2 М натрий-фосфатный буфер (pH 7,3), 0,01 М NaNO<sub>3</sub>, 0,01 М метилвиологен. К 800 мкл смеси добавляли 5 мкл пробы. Реакцию инициировали внесением в реакционную среду 100 мкл 0,1 М дитионита натрия. Продолжительность экспозиции – 10 мин. О наличии активности фермента судили по концентрации образовавшихся нитритов.

**Очистку респираторной нитратредуктазы** из бесклеточного экстракта *Thiothrix lacustris* AS проводили по следующей схеме:

**Стадия 1.** Гель-фильтрация на колонке HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare, Швеция). Препарат фильтровали через бумажные фильтры Whatman GD/X (диаметр пор 0,2 мкм) и наносили на колонку, предварительно уравновешенную буфером А (50 мМ Трис-НСl - pH 7,35, 100 мМ NaCl). Скорость потока 1 мл/мин. Детектирование поглощения осуществляли при  $\lambda=280$  нм.

**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. Локализацию нитратредуктазы в пластинке геля определяли, проведя специфическое окрашивание: пластинку геля выдерживали в смеси Б [0,2 М натрий-фосфатный буфер (pH 7,3), 0,01 М NaNO<sub>3</sub>, 0,01 М метилвиологен] 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 нанесен на колонку Mono Q, предварительно уравновешенную тем же буфером. Фермент элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl 0 – 1 М за 10 минут, измерения проводили при  $\lambda=280$  нм.

**Молекулярную массу нативного фермента** определяли по результатам нативного электрофореза в полиакриламидном геле с использованием набора маркеров High Molecular Weight Native Marker Kit (GE Healthcare). Белковые полосы проявляли по Fairbanks (1971) с модификациями. Окрашивание проводили с помощью красителя Serva BlueR.

**Для определения субъединичного состава** респираторной нитратредуктазы и массы отдельных субъединиц использовали денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле по методу Laemmli (1970) с 0,1 % SDS в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ) с помощью аппарата Mini-Protean (Bio-Rad, США). Пробы, содержавшие белок, перед нанесением смешивали с двумя объемами буфера для образцов и кипятили на водяной бане в течение 10 мин. Окрашивание проводили с помощью нитрата серебра (Покусаева и др, 2012).

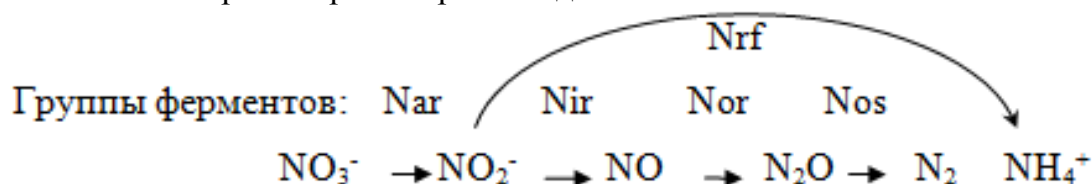


Значения  $K_m$  и  $V_{max}$  определяли с помощью графика зависимости активности фермента от концентрации субстрата. Расчеты проводили в двойных обратных координатах ( $1/V$  и  $1/[S]$ ) по графику Лайнувера-Берка (Диксон и Уэбб, 1982; Лакин, 1990). Измерения проводили спектрофотометрически.

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.

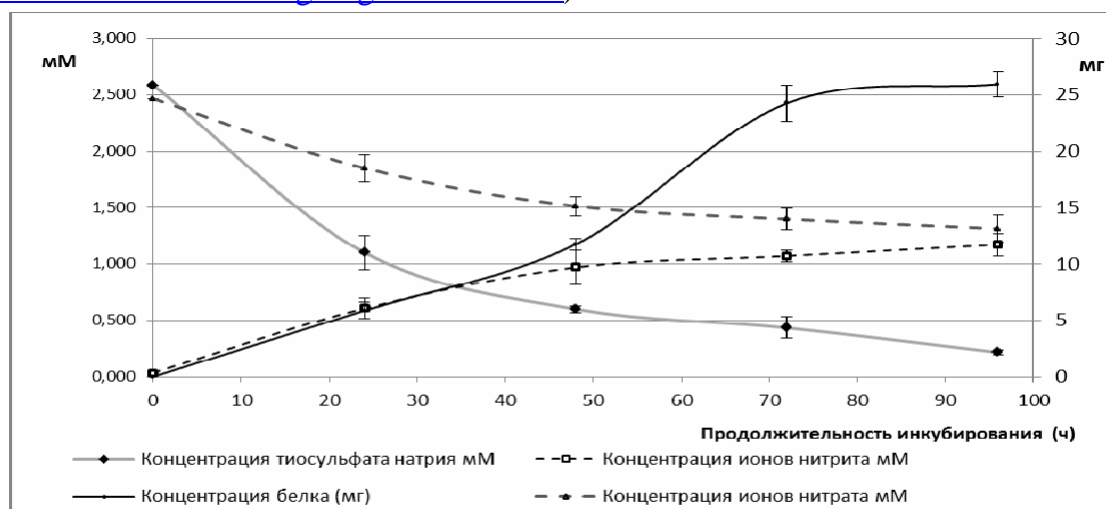
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На сегодня для прокариот показаны следующие пути диссимиляционного восстановления нитратов при анаэробном дыхании:



### 1. Анаэробный рост и динамика восстановления нитратов и образования нитритов.

Способность к анаэробному дыханию была проверена у 7 представителей двух групп *Thiothrix*. В качестве контроля использовали штаммы, для которых ранее был получен геномный сиквенс *T. nivea* JP2<sup>T</sup> (Lapidus *et al.*, 2011), *T. flexilis* EJ2M-B<sup>T</sup> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/14260>) и *T. disciformis* B3-1<sup>T</sup> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/14257>).



**Рис. 1.** Динамика окисления тиосульфата, восстановления нитрата, накопления нитрита и прироста белка при анаэробном культивировании *T. lacustris* AS.

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. Максимальный прирост белка составил для разных штаммов от 10,6 до 15,0 мг белка/л (табл. 1, рис. 1) и был отмечен через 72 ч. Анаэробный рост у данных микроорганизмов сопровождался убылью нитратов в среде культивирования и накоплением нитритов, концентрация которых составила

81-85 % от восстановленных нитратов (рис.1). В отсутствии нитратов, но в присутствии органического субстрата и тиосульфата, роста бактерий в анаэробных условиях не происходило. Накопления ионов аммония в среде культивирования обнаружить не удалось. При накоплении в среде выше 0,3–1,3 мМ нитритов было отмечено их ингибирующее влияние на бактериальный рост.

Так же была определена суммарная активность нитратредуктаз в аэробных и анаэробных условиях роста. При аэробном росте активность нитратредуктазы у разных штаммов не превышала величин 3,91–11,08 нмоль · мин<sup>-1</sup> · мг белка<sup>-1</sup>. При анаэробном росте активность фермента возрастала до 21,08–43,47 нмоль · мин<sup>-1</sup> · мг белка<sup>-1</sup>, т.е. суммарная активность нитратредуктаз была в 5 раз выше.

Можно предположить, что у исследованных штаммов в анаэробных условиях столь существенное увеличение суммарной активности нитратредуктаз происходит за счет синтеза респираторной нитратредуктазы.

## 2. Очистка и характеристика респираторной нитратредуктазы *T. lacustris* AS

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 (табл. 1).

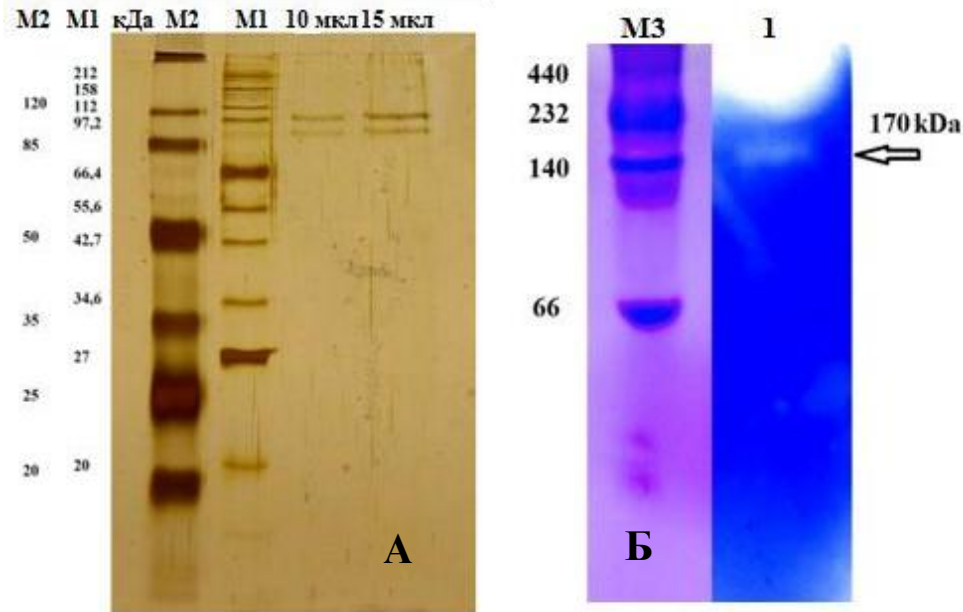
**Таблица 1.** Таблица очистки респираторной нитратредуктазы.

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 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. Предварительные исследования термостабильности белка показали возможность использования препаративного электрофореза и колоночной хроматографии при температуре 20-22 °С.

### 3. Свойства респираторной нитратредуктазы

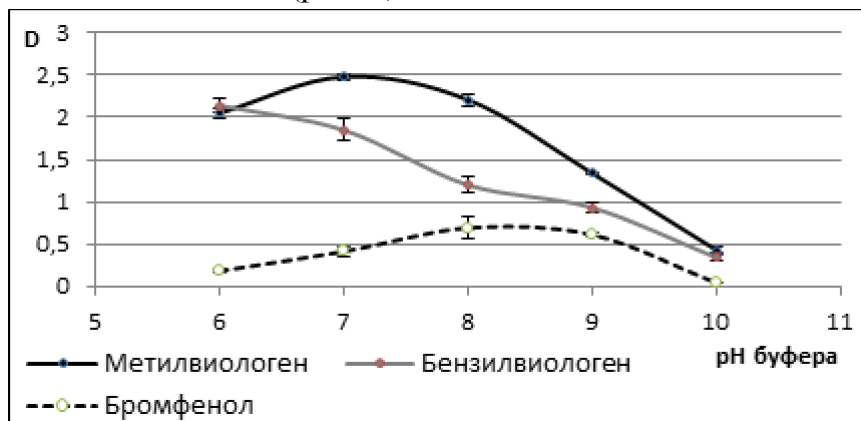
По данным денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле показано, что очищенная нитратредуктаза NarGH представляет собой гетеродимер с молекулярной массой субъединиц NarG – около 100 кДа и NarH – около 80 кДа (рис. 2 А). Молекулярная масса очищенного препарата фермента, определенная с помощью нативного электрофореза, составила 170 кДа (рис. 2 Б)



**Рис. 2.** ПААГ-электрофорез очищенного препарата нитратредуктазы.

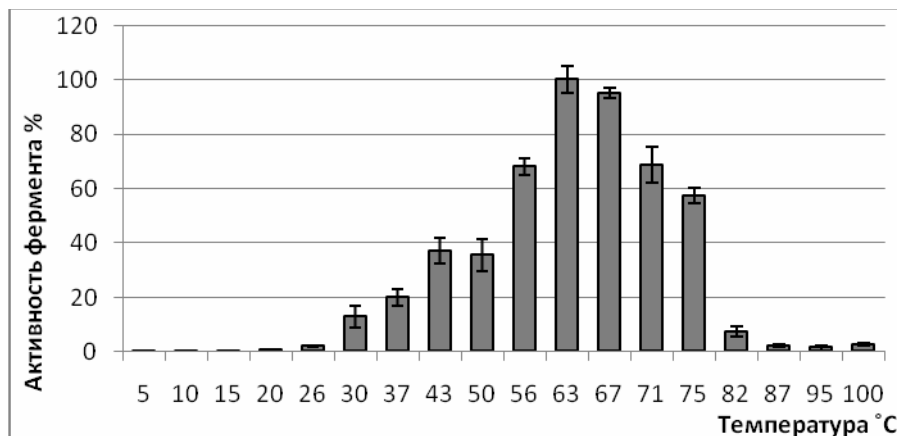
А – денатурирующий электрофорез в 10 % ПААГ; М1 – Белки-маркеры: Protein Marker, Broad Range (New England Biolabs), М2 – Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas); Окрашивание нитратом серебра. Б – нативный электрофорез в ПААГ с градиентом концентрации 4-10 %; М3 – Белки-маркеры: High Molecular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

**Влияние pH.** Исследование зависимости скорости окисления доноров электронов, таких как метилвиологен, бензилвиологен и бромфеноловый синий (для восстановления донора электронов использовали дитионит натрия) от pH среды показало, что оптимальное значение pH для работы нитратредуктазы – 7,2 – 7,3, 6,0 – 6,2 и 8,4 – 8,6, соответственно (рис. 3).



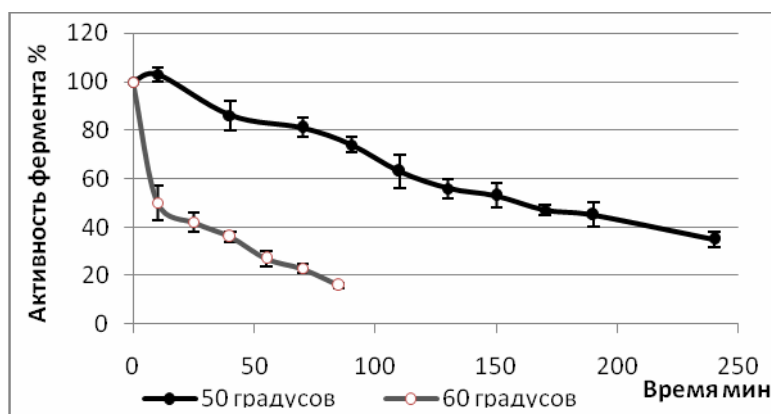
**Рис. 3.** Зависимость активности нитратредуктазы от pH среды.

**Влияние температуры.** Изучение влияния температуры на активность нитратредуктазы выявило, что температурный оптимум фермента лежит в пределах от 63 °С до 65 °С (рис. 4), 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.



**Рис. 4.** Температурный оптимум респираторной нитратредуктазы.

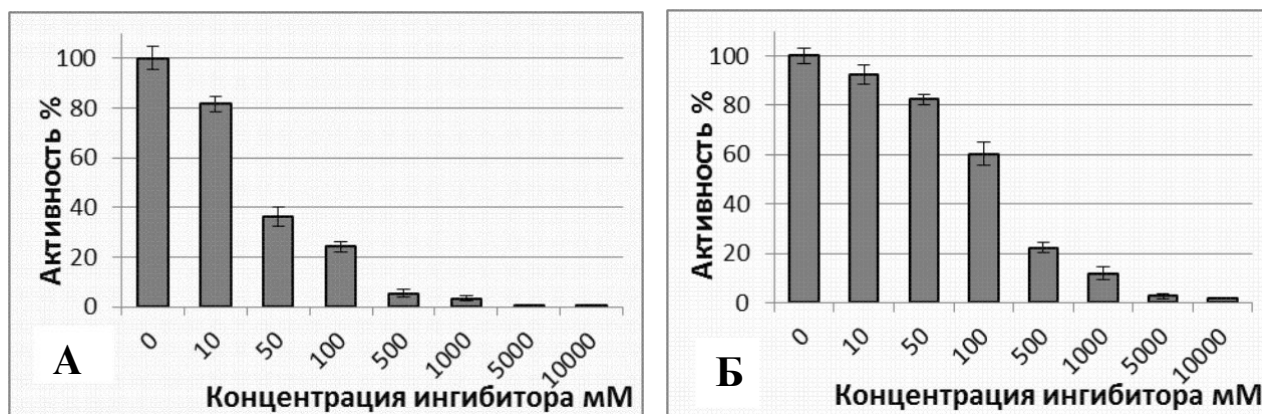
Исследование термостабильности фермента показало, что при инкубировании нитратредуктазы при 50 °С фермент терял 50 % своей начальной активности за 2 часа, при повышении температуры до 60 °С происходило снижение активности до 30 % от начального уровня в течение 1 часа экспозиции (рис. 5).



**Рис. 5.** Термостабильность респираторной нитратредуктазы.

**Кинетические характеристики фермента** были определены с использованием  $\text{NaNO}_3$  в качестве субстрата в стандартной реакционной смеси при 60 °С. Величина  $K_m$  по нитрату составила 0,234 мМ;  $V_{\max}$  – 0,945 Е/мг белка,  $V_{\max}/K_m$  – 4,03

**Ингибиторный анализ.** Бета-меркаптоэтанол и азид натрия уже в концентрации 10-50 мМ существенно ингибировали нитратредуктазу (рис. 6), в то время как ЭДТА, диэтилдитиокарбамид натрия и фенантролин оказывали слабый ингибирующий эффект.

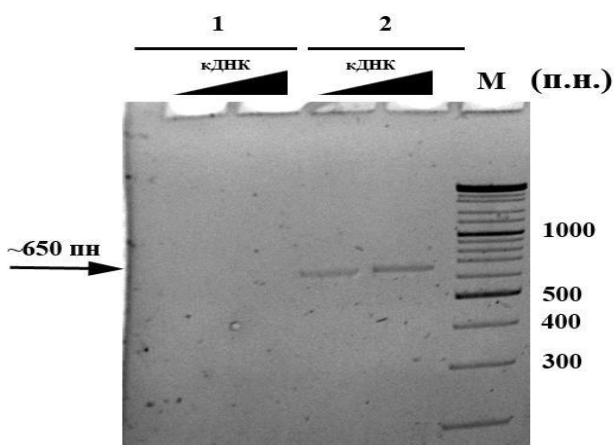


**Рис. 6.** Влияние ингибиторов (А - азид натрия, Б – бета-меркаптоэтанол) на активность респираторной нитратредуктазы, выраженное через зависимость оптической плотности реакционной смеси от концентрации ингибитора.

#### 4. Идентификация и изучение экспрессии гена *narG*, кодирующего респираторную нитратредуктазу.

Для подтверждения способности представителей рода *Thiothrix* к нитратному дыханию, в результате которого нитраты восстанавливаются до нитритов при участии респираторной нитратредуктазы (Zumft, 1997), была проведена идентификация гена *narG*: выделена геномная ДНК, проведена ПЦР-амплификация с использованием пары вырожденных праймеров, подобранных к гену *narG* (*narG*1960 F/*narG*2659R). У 7 исследованных штаммов *Thiothrix* были выявлены ампликоны ожидаемой величины - около 650 п.н. Нуклеотидные последовательности ПЦР-продуктов были определены и помещены в GenBank под номерами JX267821 (*T. caldifontis* G1<sup>T</sup>), JX267822 (*T. eikelboomii* AP3<sup>T</sup>), JX267823 (*T. unzii* A1<sup>T</sup>), JX267824 (*T. lacustris* BL<sup>T</sup>), JX267825 (*T. lacustris* AS), KF926097 (*T. caldifontis* G3), KF039721 (*T. unzii* TN).

Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностями, имеющимися в базе данных NCBI, показало, что они имеют высокую степень гомологии с фрагментами гена *narG* других прокариот, в частности, *Halomonas halodenitrificans* IFO 14912 (номер в GenBank AB076402.2). Степень гомологии составила 75,5–76,3 %. Ген *narG* не был обнаружен у *T. nivea* JP2<sup>T</sup> и *T. disciformis* B3-1<sup>T</sup>. Для представителей *T. lacustris* AS, BL<sup>T</sup>, *T. caldifontis* G1<sup>T</sup>, *T. unzii* A1<sup>T</sup>, TN и *T. eikelboomii* AP3<sup>T</sup>, была выделена 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 (детекция начиналась на 26-27 циклах ПЦР). При аэробном росте культуры синтеза ампликона ожидаемого размера не наблюдалось (рис.7) или же он был очень слабым.



**Рис. 7.** Анализ уровня экспрессии гена *narG* у *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).

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

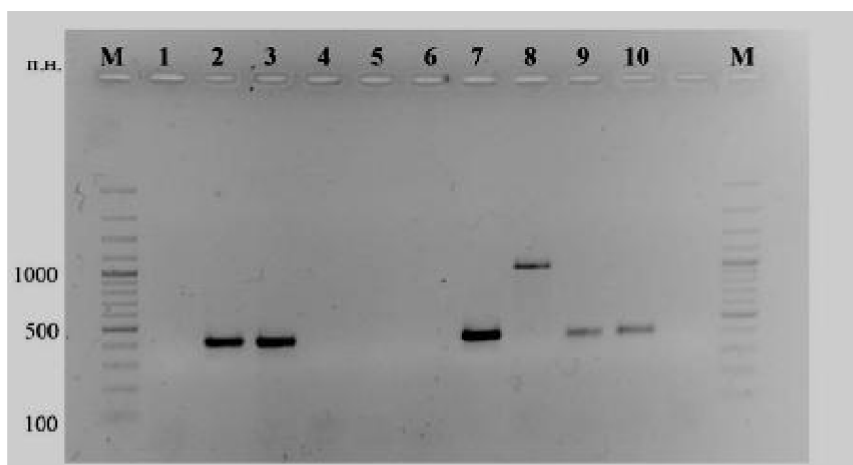
Для того, чтобы выявить способность представителей рода *Thiothrix*, имеющих ген *narG*, к дальнейшему восстановлению нитритов, мы проверили их способность к образованию  $N_2$  при анаэробном росте в присутствии нитратов и закиси азота. В этом эксперименте бактерии культивировали в анаэробных условиях во флаконах с газовой фазой: 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  $N_2O$ . Удалось зафиксировать увеличение концентрации молекулярного азота (концентрация  $N_2$  возрастала в 3-4 раза 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 концентрации белка (до 10 мг/л) и окислением тиосульфата (до 1 мМ). Полученные предварительные данные свидетельствуют о возможности денитрификации с восстановлением нитратов до молекулярного азота. Для выяснения этого процесса в дальнейшем мы использовали молекулярные методы исследования.

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

**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*. 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.

Для идентификации гена *nirS* использовалась пара праймеров nirS 1F-E7/nirS 6R-F7. ПЦР амплификация геномной ДНК штаммов *Thiothrix* дала продукт ожидаемой величины (850-870 п.н.) только для штамма *T. lacustris* AS. Секвенирование полученного продукта подтвердило его специфичность. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена *nirS* *T. lacustris* AS была помещена в GenBank под номером KC855765.

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 Tool ([www.genebee.msu.ru/services/malign\\_reduced.html](http://www.genebee.msu.ru/services/malign_reduced.html)), 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. ПЦР со специфичными праймерами показала наличие продуктов ещё у трёх штаммов: *T. unzii*A1<sup>T</sup>, *T. caldifontis*G1<sup>T</sup>, *T. caldifontis* G3 (рис. 8).



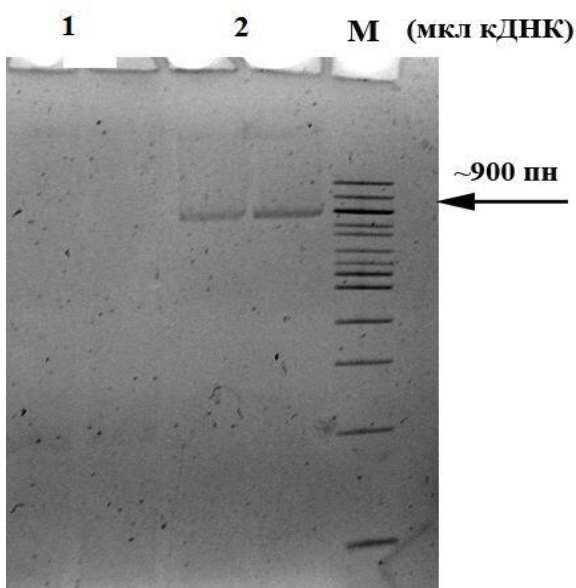
**Рис. 8.** Электрофорез в агарозном геле (1,2 %) продуктов ПЦР-амплификации, полученных с использованием специфичных праймеров (nirS\_AS-F и nirS\_AS-R) к гену *nirS*.

1 – *T. eikelboomii* AP3<sup>T</sup>; 2, 3 – *T. unzii* A1<sup>T</sup>; 4 – *T. unzii* TN; 5 – *T. nivea* JP2<sup>T</sup>; 6 – *T. flexilis* EJ2M-B<sup>T</sup>; 7 – *T. lacustris* AS; 8 – *T. Lacustris* BL<sup>T</sup>; 9 – *T. caldifontis* G1<sup>T</sup>; 10 – *T. caldifontis* G3. М – маркеры ДНК O'GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas).

Продукты были очищены и определены их нуклеотидные последовательности, которые были помещены в GenBank под номерами KC855767 (*T. unzii*A1<sup>T</sup>), KC855768 (*T. caldifontis*G1<sup>T</sup>), KF926096 (*T. caldifontis*G3). У других исследованных штаммов рода *Thiothrix*: *T. nivea* JP2<sup>T</sup>, *T. lacustris* BL<sup>T</sup>, *T. unzii* TN, *T. eikelboomii*AP3<sup>T</sup>, *T. Flexilis* EJ2M-B<sup>T</sup> не были обнаружены продукты гена *nirS*.



Для *T. lacustris* AS из клеток, выросших как в аэробных, так и в анаэробных условиях, была выделена 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. 9). Следовательно, 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. 9.** 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).

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.

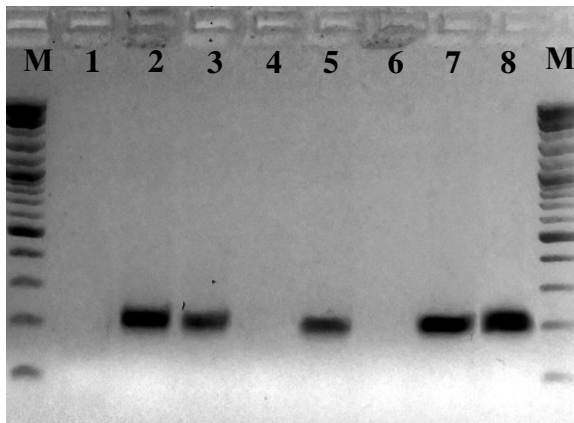
**Детекция NO-редуктазы и N<sub>2</sub>O-редуктазы.** Для обнаружения генов *snorB* и *qnorB*, кодирующих цитохром-с и хинол-зависимые NO-редуктазы, использовались вырожденные праймеры *snorB2F/snorB6R* и *qnorB2F/qnorB7R*, соответственно. По результатам амплификации участка гена *snorB* продукты ожидаемой 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<sup>T</sup>, *T. lacustris* BL<sup>T</sup>, *T. caldifontis* G1<sup>T</sup>, *T. eikelboomii* AP3<sup>T</sup>, *T. flexilis* EJ2M-B<sup>T</sup> с вырожденными праймерами 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/cnorBThR*, 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. 10). Полученные фрагменты генов *snorB* были помещены в GenBank под номерами KJ748493 (*T. unzii* A1<sup>T</sup>), KJ748494 (*T. caldifontis* G1<sup>T</sup>).



**Рис. 10.** Электрофорез в агарозном геле (1,2 %) продуктов ПЦР-амплификации, полученных с использованием специфичных праймеров *snorBThF/cnorBThR*. 1 – *T. eikelboomii* AP3<sup>T</sup>; 2 – *T. unzii* A1<sup>T</sup>; 3 – *T. unzii* TN; 4 – *T. nivea* DSM 5205<sup>T</sup>; 5 – *T. lacustris* AS; 6 – *T. lacustris* BL<sup>T</sup>; 7 – *T. caldifontis* G1<sup>T</sup>; 8 – *T. caldifontis* G3. М – маркеры ДНК O'GeneRuler DNA LadderMix.

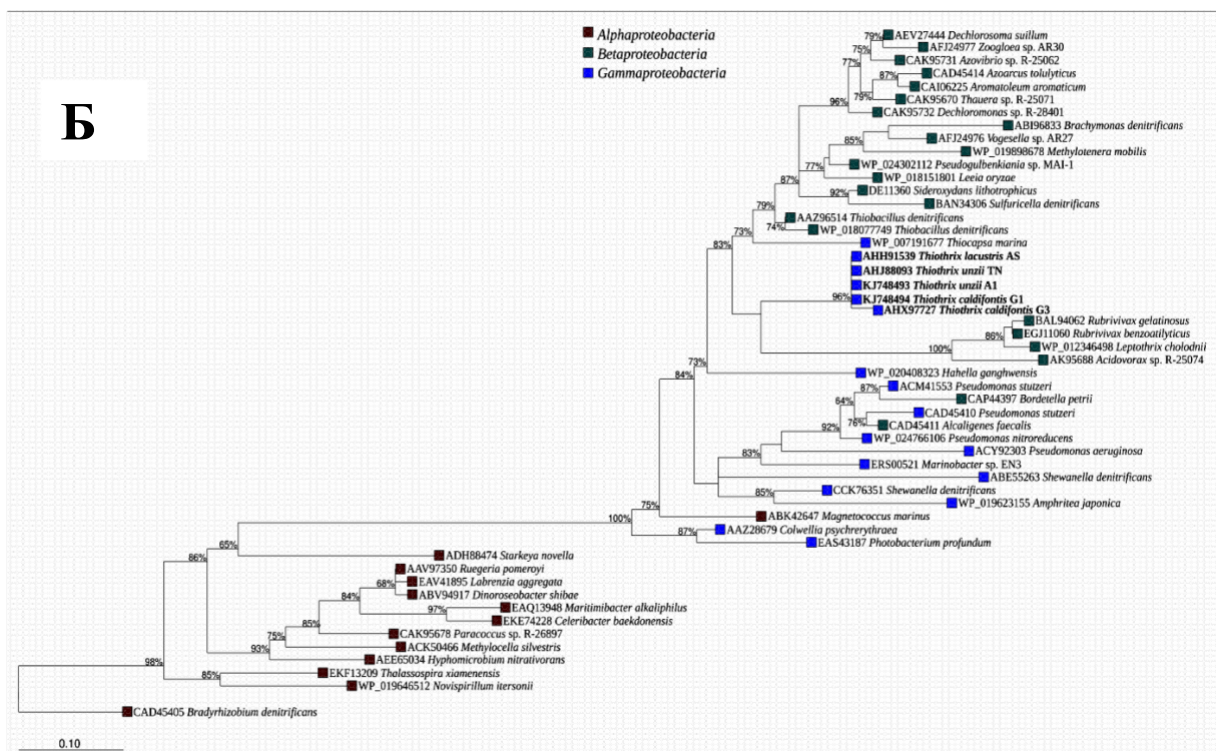
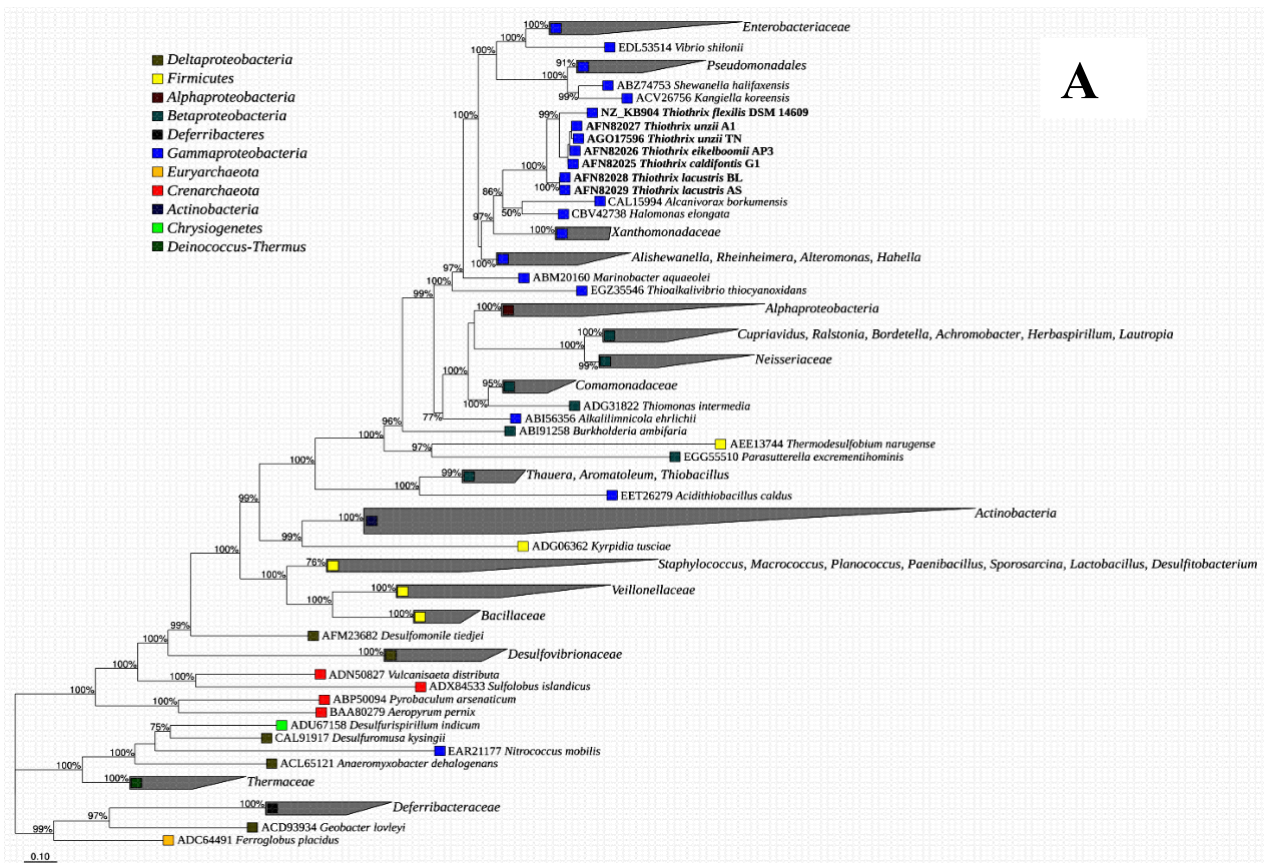
Для обнаружения одного из генов (*nosZ*), кодирующих N<sub>2</sub>O-редуктазу (NosRZDFYLX), были использованы вырожденные праймеры Nos661F/Nos1773R (1112 п.о.) и nosZF/nosZR (700 п.н.). По результатам амплификации участка гена *nosZ* продукты ожидаемой длины ни у одного из изучаемых организмов не были выявлены. Однако, учитывая способность некоторых представителей рода *Thiothrix* при анаэробном дыхании образовывать молекулярный азот при росте на нитратах и закиси азота (см. раздел 5), мы можем предположить наличие гена *nosZ* у этих бактерий. Вероятно, использованные праймеры не подходят для данной группы бактерий.

## 7. Филогенетический анализ

В результате проведения филогенетического анализа аминокислотных последовательностей субъединиц NarG, NirS и CnorB бактерий рода *Thiothrix* были построены филогенетические деревья. Последовательности NarG (рис. 11 А) и NirS штаммов рода *Thiothrix* тесно сгруппированы и являются частью филогенетического кластера, объединяющего большинство представителей класса *Gammaproteobacteria*.

Филогенетический анализ субъединиц CnorB показал, что последовательности из представителей *Thiothrix* плотно сгруппированы, но эта группа окружена последовательностями в основном, принадлежащими представителям *Betaproteobacteria* (рис. 11 Б).

Полученные результаты могут означать, что ген *snorB* был подвергнут горизонтальному переносу генов перед разделением современных видов рода *Thiothrix* от последнего общего предка этого рода, гены *narG*, и *nirS* были изначально представлены в геноме *Thiothrix* и горизонтальному переносу не подвергались.



**Рис. 12.** Филогенетические деревья, построенные на основе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей альфа-субъединицы дыхательной нитратредуктазы [NarG (A)] и NO-редуктазы субъединицы B, (*cnorB*).

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

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

**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 большого объема 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 ферментере в 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 респираторной нитратредуктазы. Таким образом, удалось в короткие сроки получить большой объем биомассы, содержащей исследуемый фермент.

**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 активность нами была определена масса искомого фермента, она составила 170 – 180 кДа. Это позволило посредством гель-фильтрации отделить все фракции с белком молекулярной массой менее 150 кДа.

Таким образом, удалось более чем в 3 раза снизить общий объем белка без существенной потери активности. Анионообменная хроматография на колонке Mono Q HR 16/10 помимо разделения белков по заряду позволила сконцентрировать белковый препарат. 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. На выходе мы получили концентрированный препарат белка в небольшом объеме, что позволило использовать в качестве следующего этапа очистки препаративный электрофорез. 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. Кроме того, 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 полосу геля, содержащую белок вырезали, измельчили и смешали с большим (30-кратным) объемом буфера для облегчения процесса диффузии.

Таким образом, был получен большой объем препарата белка с низкой концентрацией и степенью очистки 33. Завершающим этапом очистки была повторно выбрана анионообменная хроматография на колонке Mono Q. Для элюции использовали более широкий градиент NaCl, сократив при этом продолжительность элюции, что привело к концентрированию препарата белка. 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. Однако в целом считаем данную схему очистки оптимальной для выделения респираторной нитратредуктазы из *Thiothrix*.

**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<sup>T</sup>, *T. lacustris* BL<sup>T</sup>, *T. lacustris* AS, *T. caldifontis* G1<sup>T</sup>, *T. unzii* A1<sup>T</sup>, *T. unzii* TN, *T. eikelboomii* AP3<sup>T</sup>, *T. disciformis* B3-1<sup>T</sup>, *T. flexilis* EJ2M-B<sup>T</sup>).

У восьми штаммов пяти видов (*T. lacustris* BL<sup>T</sup>, AS, *T. caldifontis* G1<sup>T</sup>, G3, *T. unzii* A1<sup>T</sup>, TN, *T. eikelboomii* AP3<sup>T</sup>, *T. flexilis* EJ2M-B<sup>T</sup>) обнаружена способность к анаэробному нитратному дыханию.

Показано, что при анаэробном росте на нитратах последние восстанавливаются до нитритов. У исследованных представителей рода *Thiothrix* выявлено наличие в клетках гена *narG*, кодирующего альфа-субъединицу респираторной нитратредуктазы NarGHI, и показана его экспрессия при анаэробном культивировании бактерий. 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. 2).

**Таблица 2.** Способность к денитрификации у представителей рода *Thiothrix*

Этапы денитрификации и параметры, указывающие на их наличие		<i>T. lacustris</i> AS	<i>T. lacustris</i> BL <sup>T</sup>	<i>T. unzii</i> A1 <sup>T</sup>	<i>T. unzii</i> TN	<i>T. caldifontis</i> G1 <sup>T</sup>	<i>T. eikelboomii</i> AP3 <sup>T</sup>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ген <i>narG</i>	+	+	+	+	+	+
	Продукт	+	+	+	+	+	+
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> → NO	Ген <i>nirS</i>	+	-	+	-	+	-
	Продукт	но	но	но	но	но	но
NO → N <sub>2</sub> O	Ген <i>snorB</i>	+	-	+	+	+	-
	Продукт	но	но	но	но	но	но
N <sub>2</sub> O → N <sub>2</sub>	Ген <i>nosZ</i>						
	Продукт	+	но	+	+*	+	но

Примечание: но – не определяли; \* - N<sub>2</sub> был обнаружен только при росте с N<sub>2</sub>O

Оказалось, что 5 штаммов из 3 видов обладают способностью к денитрификации. *T. lacustris* AS, *T. caldifontis* G1<sup>T</sup>, *T. caldifontis* G3, *T. unzii* A1<sup>T</sup> способны восстанавливать нитрит до окиси и закиси азота (обнаружен ген *nirS*, кодирующий нитритредуктазу NirS, и показана его экспрессия в анаэробных условиях, *snorB*, кодирующий цитохром-с зависимую NO-редуктазу), тогда как у *T. unzii* TN не был обнаружен ген *nirS*, но выявлен ген *snorB*. 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 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> → NO<sub>2</sub>; NO → N<sub>2</sub>O), т.е. у него наблюдается «усеченная» денитрификация.

У двух штаммов 2 видов, способных к нитратному дыханию (*T.lacustris* BL<sup>T</sup>, *T. eikelboomii* AP3<sup>T</sup>), 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<sup>T</sup> (Lapidus *et al.*, 2011), *T. flexilis* EJ2M-B<sup>T</sup> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/14260>), *T. disciformis* B3-1<sup>T</sup> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/14257>) на основе анализа геномного сиквенса (в геноме отсутствуют гены ферментов, участвующие в денитрификации).

Ни один из исследованных представителей рода *Thiothrix* не обнаружил способности к диссимиляционному восстановлению NO<sub>2</sub><sup>-</sup> до NH<sub>3</sub>, что подтверждается как отсутствием гена *nrfA*, так и отсутствием накопления NH<sub>3</sub> в среде культивирования в качестве конечного продукта при анаэробном росте. Из двух альтернативных нитритредуктаз - NirS и NirK, ответственных за восстановление NO<sub>2</sub><sup>-</sup> до NO, у всех исследованных штаммов ген *nirK* не был обнаружен. Также ни у одного штамма не был выявлен ген *qnorB*, кодирующий хинолзависимые 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 *cnorB* и *qnorB*, а также *nirS* и *nirK*).

Для штаммов, у которых обнаружен ген *nirS* или *cnorB*, среди конечных продуктов анаэробного восстановления закиси азота, было зарегистрировано образование N<sub>2</sub> (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<sub>2</sub>. Детальное исследование этого процесса у представителей рода *Thiothrix* представляет важнейшую задачу изучения анаэробного метаболизма этой группы серобактерий.

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 CnorB показал, что представители *Thiothrix*, относящихся к *Gamma*proteobacteria, плотно сгруппированы, но окружены бактериями, в основном принадлежащими к *Beta*proteobacteria. Это может означать, что ген *cnorB* 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  $\alpha$ -субъединицу респираторной нитратредуктазы NarGH<sub>I</sub>, 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 – около 100 кДа и NarH – около 80 кДа.

4. Определены физико-химические параметры респираторной нитратредуктазы из *T. lacustris* AS: температурный и pH 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<sup>T</sup>, G3; *T. unzii* A1<sup>T</sup>; показана экспрессия гена *nirS* для *T. lacustris* AS; ген *cnorB*, кодирующий цитохром-с зависимую NO-редуктазу, обнаружен у *T. lacustris* AS; *T. caldifontis* G1<sup>T</sup>, G3; *T. unzii*A1<sup>T</sup>, 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.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность к.б.н. Антипову А.Н., к.б.н. Тутукиной М.Н., к.б.н. Колгановой Т.В. за методическую и практическую помощь в проведении биохимических и молекулярно-биологических исследований, а так же Меркель А.Ю. за помощь в проведении филогенетического анализа. Автор глубоко признателен д.б.н. Грабович М.Ю. за помощь в подготовке настоящей работы и плодотворное обсуждение ее этапов. Особую благодарность автор выражает всему коллективу кафедры биохимии и физиологии клетки ВГУ, лаборатории микробной энзимологии ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН за предоставленное научное оборудование и методическую помощь в выполнении работы.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в журналах, рекомендованных ВАК

1. Трубицын И.В., Андреевских Ж.Г., Баркалова Е.В., Антипов А.Н. Биохимические и генетические аспекты диссимиляционной нитратредукции у представителей рода *Thiothrix* // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2011. - Т. 38. - Вып. 4/1. - С. 58 – 59.
2. Трубицын И. В., Андреевских Ж. Г., Юревич Л. И., Белоусова Е. В., Тутукина М. Н., Меркель А. Ю., Дубинина Г. А., Грабович М. Ю. Способность к нитратному дыханию как новый аспект метаболизма нитчатых серобактерий рода *Thiothrix* // Микробиология. - 2013. - Т. 82, № 1, - С. 19-26.
3. Трубицын И.В., Грабович М.Ю., Тутукина М.Н. Респираторная нитратредуктаза из *Thiothrix lacustris* AS: очистка, физико-химические свойства и каталитические характеристики // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2014. - Т. 14. - Вып. 2. - С. 65-73.
4. Trubitsyn I.V., Belousova E.V., Tutukina M.N., Merkel A.Yu., Dubinina G. A., and Grabovich M.Yu. Expansion of ability to denitrification within the filamentous colourless sulfur bacteria of the genus *Thiothrix* // FEMS Microbiology Letters. - 2014. - V. 358. - P. 72-80.

### Статьи в сборниках научных трудов, тезисы докладов

5. Трубицын И.В., Антипов А.Н., Андреевских Ж.Г., Баркалова Е.В., Грабович М.Ю. Выделение и физико-химические свойства нитратредуктазы *Thiothrix* sp. штамм AS, участвующей в анаэробном дыхании // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. - 2011. - Вып. 13. - С. 184-189.
6. Трубицын И.В., Андреевских Ж.Г., Белоусова Е.В., Сапельцева Ю.О., Грабович М.Ю. Молекулярно-биологические аспекты диссимиляционной нитратредукции у представителей рода *Thiothrix* // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. - 2012. - Вып. 14. - С. 206-210.
7. Грабович М.Ю., Белоусова Е.В., Трубицын И.В. Роль микроорганизмов в круговороте азота: учебное пособие. Воронеж: ВГУ. – 2014. - 65 с.
8. Андреевских Ж.Г., Трубицын И.В., Тутукина М.А., Баркалова Е.В. Первый представитель рода *Thiothrix*, способный к диссимиляционной нитратредукции. Тезисы 15 Международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука 21-го века». - Пушкино, 2011. С 343 – 344.
9. Трубицын И.В. Диссимиляционная нитратредукция, как альтернативный путь энергетического метаболизма в анаэробных условиях, впервые установленная для представителя рода *Thiothrix* / И.В. Трубицын, Ж.Г. Андреевских, М.А. Тутукина, Е.В. Баркалова, М.Ю. Грабович // Симбиоз Россия 2011: материалы IV Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов. – Воронеж. – 2011. – С. 49 – 50.
10. Сапельцева Ю.О., Юревич Л.И., Трубицын И.В., Андреевских Ж.Г. Диссимиляционная нитратредукция у представителей рода *Thiothrix*. Тезисы 16 Международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука 21-го века». - Пушкино, 2012. - С 36 -37.
11. Grabovich M., Trubitsyn I., Yurevich L., Belousova E., Tutukina M., Merkel A., Dubinina G. Capacity for nitrate respiration as a new aspect of metabolism of the filamentous sulfur bacteria of the genus *Thiothrix* / 5th FEMS Congress of European Microbiologists: book of abstracts. Leipzig, Germany. 2013.