# МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

## высшего образования

«Воронежский государственный университет»

На правах рукописи

Гуреева Мария Валерьевна

# БИОРАЗНООБРАЗИЕ НОВЫХ НИТЧАТЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *BEGGIATOACEAE* И АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДОВ *BEGGIATOA*, *THIOFLEXITHRIX* И *AZOSPIRILLUM*

Специальность 03.02.03 – микробиология

# ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель: д.б.н., проф. М.Ю. Грабович

ВОРОНЕЖ – 2019

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>OI JIADJIEII</b> IIE	
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность проблемы	6
Цель и задачи исследования	8
Научная новизна и значимость работы	9
Практическая значимость	9
Апробация работы	10
Публикации	10
Объем и структура диссертации	11
Место проведения работы и благодарности	11
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
Глава1. Бесцветные серобактерии	12
1.1. Проблемы классификации	13
1.2. Морфотипы сероокисляющих бактерий из семейства Beggiatoaceae	15
1.3. Физиология сероокисляющих бактерий из семейства Beggiatoaceae	19
1.4. Культивирование представителей семейства Beggiatoaceae	21
1.5. Экология представителей семейства Beggiatoaceae	22
Глава 2. Метаболизм представителей семейства Beggiatoaceae	25
2.1. Серный метаболизм у представителей семейства Beggiatoaceae	25
2.1.1. Окисление сульфида	25
2.1.2. Окисление элементной серы	26
2.1.3. Окисление сульфита	28
2.1.4. Пути окисления тиосульфата	32
2.2. Автотрофия у представителей семейства Beggiatoaceae	36
2.3. Метилотрофия у представителей семейства Beggiatoaceae	37
2.4. Литотрофный рост представителей семейств Beggiatoaceae на водороде	38
2.5. Образование полисахаридных чехлов	39
Глава 3. Новые «бесцветные серобактерии»	42
3.1. Серный метаболизм у Azospirillum	44
3.2. Автотрофия у представителей рода Azospirillum	44
3.3. Метилотрофия у представителей рода Azospirillum	45
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ	46
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	48
Глава 4. Объекты и методы исследования	48
4.1. Объекты исследования	48
4.2. Методы исследования	48
4.2.1. Состав питательных сред	48

4.2.2. Микроаэробное культивирование	49
4.2.3. Методы изучения морфологии, ультрастуктуры и внутриклеточных вклю	чений50
4.2.4. Получение клеточной суспензии и ферментных экстрактов	50
4.2.5. Методы определения активности ферментов	51
4.2.6. Физико-химические методы анализа	53
4.2.6.1. Определение хинонов	53
4.2.6.2. Анализ жирнокислотного состава	
4.2.6.3. Методы определения продуктов превращения соединений серы	
4.2.7. Методы молекулярной биологии и биоинформатики	
4.2.7.1. Выделение ДНК, секвенирование и аннотирование геномов	
4.2.7.2. Построение филогенетических деревьев и статистическая оценка резуль- кластеризации	г <b>атов</b> 55
4.2.7.3. Определение уровня экспрессии генов	55
4.2.8. Определение общего содержания углеводов	
4.2.9. Выделение экзополисахаридов	57
4.2.10. Определение моносахаридного состава полисахаридов	57
4.2.11. Получение ЯМР-спектра	58
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	59
Глава 5. Нитчатые представители семейства Beggiatoaceae	59
5.1. Штамм D3	59
5.1.1. Выделение штамма D3	59
5.1.2. Морфология клеток	61
5.1.3. Физиологические характеристики	62
5.1.4. Хемотаксономический анализ	65
5.1.5. Филогенетический анализ	66
5.1.6. Диагноз <i>Thioflexithrix</i> gen. nov.	66
5.1.7. Диагноз <i>Thioflexithrix psekupsensis</i> sp. nov.	
5.1.8. Характеристика генома	69
5.1.9. Автотрофный рост	
5.1.10. Серный метаболизм	
5.1.11. Литотрофный рост в присутствии молекулярного водорода	76
5.1.12. Определение количества экзополисахаридов (ЭПС) и их мономерного сос Гены, кодирующие ферменты, участвующие в синтезе галактана	<b>тава.</b> 77
5.1.13. Ферменты, участвующие в защите от кислорода у <i>T. psekupsensis</i> D3 <sup>T</sup>	
5.1.14. Центральный метаболизм	82
5.1.15. Дыхательная цепь	82
5.2. Beggiatoa leptomitoformis D-402 <sup>T</sup>	
5.2.1. Морфология клеток	
5.2.2. Физиологические характеристики	

5.2.3. Хемотаксономический анализ	86
5.2.4. Филогенетический анализ	88
5.2.5. Диагноз Beggiatoa leptomitoformis sp. nov	89
5.2.5. Характеристика генома	
5.2.6. Серный метаболизм	
5.2.7. Литотрофный рост в присутствии молекулярного водорода	
5.2.8. Метаболизм С1-соединений	
5.2.8.1. Окисление С1-соединений до СО2	
5.2.8.2. Окисление метанола до формальдегида	
5.2.8.3. Окисление формальдегида до формиата и СО2	
5.2.8.4. Рост <i>В. leptomitoformis</i> <b>D-402</b> в присутствии метанола	
5.2.8.5. Активность метанолдегидрогеназы и формиатдегидрогеназы	
5.2.8.6. Уровень экспрессии генов <i>mdh2</i> и <i>хохF</i>	100
5.2.8.7. Ассимиляция углерода из С1-соединений для анаболизма	101
5.2.9. Центральный метаболизм	103
5.2.10. Дыхательная цепь	103
Глава 6. Azospirillum thiophilum BV-S <sup>T</sup>	105
6.1. Характеристика генома	105
6.2. Литотрофный рост в присутствии тиосульфата	108
6.3. Литотрофный рост в присутствии молекулярного водорода	
6.4. Автотрофный рост	111
6.5. Метаболизм С1-соединений	
6.5.1. Окисление метанола	113
6.5.2. Окисление формальдегида	115
6.5.3. Окисление формиата	115
6.6. Центральный метаболизм	
6.7. Дыхательная цепь	121
6.8. Терминальные оксидоредуктазы анаэробного дыхательного пути	122
6.9. Азотфиксация	123
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
ВЫВОДЫ	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	133
ПРИЛОЖЕНИЕ	

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

**CDS** – кодирующие последовательности СоА – кофермент А **DTT** – дитиотреитол **HPLC** - высокоэффективная жидкостная хроматография **PQQ** - пиррохинолинхинон АДФ – аденозиндифосфат АТФ – аденозинтрифосфат ГЖХ – газо-жидкостная хроматография ГТФ – гуанозинтрифосфат ДМС - диметилсульфид ДМСО – диметилсульфоксид **ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота КФ - код фермента МДГ – метанолдегидрогеназа ПААГ – полиакриламидный гель

ПС – полисахариды ПЦР – полимеразная цепная реакция РБФКрибулозобисфосфаткарбоксилаза РНК – рибонуклеиновая кислота СОД – супероксиддисмутаза т.п.о. – тысячи пар оснований ТАА - тиоацетамид ТГМП – тетрагидрометаноптерин ТДЕ - тиодиэтанол УФ - ультрафиолетФДГ – формиатдегидрогеназа ФЕП – фосфоенолпируват ЦТК – цикл трикарбоновых кислот ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота ЭПС - экзополисахариды **ЯМР -** ядерный магнитный резонанс

### введение

#### Актуальность проблемы

Бесцветные серобактерии – уникальная группа микроорганизмов. Представители семейства *Beggiatoaceae* в большинстве случаев относятся к некультивируемым формам, характеризуются впечатляющим морфологическим разнообразием – нити; пучки нитей, окруженные общей слизистой оболочкой; нити, растущие в виде розеток; одиночные клетки (Salman et al., 2011, 2013). Размер клеток может варьировать у разных представителей от 1 до 200, а порой до 750 мкм. Они обитают в водных экосистемах, в противоположно направленных градиентах сероводорода и кислорода. Способны использовать восстановленные соединения серы в качестве донора электронов для энергетического метаболизма, а их окисление при этом сопровождается накоплением элементной серы в клетках (Winogradsky, 1887; Nelson and Jannasch, 1983). Окисление восстановленных соединений серы может быть сопряжено с восстановлением кислорода или нитратов.

Бесцветные серобактерии образуют мощные обрастания на дне водоемов в местах выхода сероводорода - токсичного газа, который больших В рыб, ингибирует концентрациях вызывает отравление промысловых дыхательную препятствуя окислительному фосфорилированию. цепь, Сероокисляющие бактерии могут быть естественными фильтрами, которые метаболизируют токсичные соединения серы и препятствуют поступлению сероводорода в вышележащие слои.

Таксономия сероокисляющих бактерий остается слаборазработанной. Об этом свидетельствует постоянно меняющаяся классификация данной группы. бесиветных серобактерий, Большинство относящихся к классу гаммапротеобактерии, традиционно классифицировали в три семейства по морфологическим признакам: (1) *Beggiatoaceae* (Leadbetter 1974; Strohl 1989); (2) Leucotrichaceae (Buchanan 1957; Brock 1974); и (3) Achromatiaceae (Van Niel 1948). В последнем издании определителя Берги, посвященном протеобактериям, большинство сероокисляющих гаммапротеобактерий были отнесены к семейству *Thiotrichaceae* (Garrity et al., 2005). В 2011 году была опубликована статья Salman et al., в которой указывалось, что эта реклассификация не основывается на филогенетических данных и противоречит правилу 51b Бактериологического кодекса (Lapage et al., 1992). Salman с соавторами предложили вернуть семейство *Beggiatoaceae* и включить в него роды, наиболее близкие к *Beggiatoa*, а также добавить в состав семейства девять новых видов входящих в семь новых родов со статусом *Candidatus*.

Развитие технологий геномного секвенирования и получение информации о геномах микроорганизмов существенно расширяет возможности изучения их таксономии и метаболизма. В настоящее время предложено построение новой таксономии прокариот на основе построения филогенетических деревьев по конкатенированным последовательностям 120 белков (Parks et al., 2018). Согласно ей, семейство *Beggiatoaceae* следует относить к отдельному порядку *Beggiatoales*. В состав семейства планируется включить рода *Beggiatoa, Marithrix, Thioflexithrix* и *Thioploca* (http://gtdb.ecogenomic.org/tree). Итак, открытия последних десятилетий показывают, что наши знания о таксономии бесцветных серобактерий, в частности семейства *Beggiatoaceae*, ставит много вопросов, которые пока остаются без ответов.

За последние 8-10 лет были существенно расширены знания о биохимических деталях различных путей окисления восстановленных соединений серы. Кроме того, стало доступно значительное количество дополнительных геномных последовательностей для серобактерий, что позволяет получать дополнительную информацию по механизмам превращения соединений серы и эволюции генов, ответственных за данные процессы.

Так в последнее десятилетие для многих прокариот, которые раннее считались типичными гетеротрофами, была показана способность к литотрофному росту за счет окисления восстановленных соединений серы, а при окислении сероводорода в клетках показано отложение элементной серы, что характерно для бесцветных серобактерий: *Azospirillum thiophilum* (Фролов и др., 2013), *Leucothrix mucor* (Grabovich et al., 1999), *Sphaerotilus natans* subsp.

7

*sulfidivorans* (Gridneva et al., 2011). Несмотря на достижения в изучении биологии бесцветных серобактерий, все еще остаётся много пробелов в знаниях об их метаболическом потенциале.

В данной работе проводится таксономическое описание двух новых сероокисляющих бактерий из семейства *Beggiatoaceae – Thioflexithrix psekupsensis* gen. nov., sp. nov. и *Beggiatoa leptomitoformis* sp. nov., а также анализ геномов для выявления метаболического разнообразия представителей родов *Beggiatoa*, *Thioflexithrix* и *Azospirillum*.

#### Цель и задачи исследования

Цель работы - таксономическое описание двух новых представителей семейства *Beggiatoaceae* и анализ геномов для выявления метаболического разнообразия литотрофных серооокисляющих бактерий из семейства *Beggiatoaceae* и *Azospirillum thiophilum*.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

**1.** Провести полифазный анализ и таксономическое описание двух новых представителей семейства *Beggiatoaceae*.

**2.** Осуществить биоинформатический анализ геномов *Thioflexithrix psekupsensis* D3<sup>T</sup>, *Beggiatoa leptomitoformis* D-402<sup>T</sup> и *Azospirillum thiophilum* BV-S<sup>T</sup>.

**3.** Выявить в геномах *T. psekupsensis*, *B. leptomitoformis* и *A.thiophilum* гены, кодирующие ферменты диссимиляционных путей превращения восстановленных соединений серы и молекулярного водорода; экспериментально подтвердить способность к литотрофии.

**4.** Осуществить поиск в геномах генов, кодирующих ферменты автотрофного пути ассимиляции CO<sub>2</sub>, и экспериментальную проверку способности к автотрофному росту при разных кислородных режимах.

**5.** Выявить в геномах гены, кодирующие ферменты, участвующие в использовании C<sub>1</sub>-соединений в качестве источников углерода и энергии при метилотрофном росте; установить пути превращения метанола и экспериментально проверить полученные геномные данные.

**6.** Установить способность к ассимиляции N<sub>2</sub> и тип дыхательного метаболизма.

### Научная новизна и значимость работы

Расширены представления о таксономическом разнообразии нитчатых пресноводных серобактерий семейства *Beggiatoaceae*. До наших исследований семейство *Beggiatoaceae* содержало лишь один валидно описанный вид – *Beggiatoa alba*. В ходе данной работы были описаны два новых таксона в составе семейства *Beggiatoaceae* (новый род и два новых вида): *Beggiatoa leptomitoformis* sp. nov. и *Thioflexithrix psekupsensis* gen. nov., sp. nov.

Получены полные геномные последовательности *B. leptomitoformis* (NZ\_CP012373.1), *Azospirillum thiophilum* (NZ\_CP012401.1-NZ\_CP012408.1) и драфт-геном *T. psekupsensis* (NZ\_MSLT00000000.1). Анализ геномов и экспериментальные данные позволили выявить метаболическое разнообразие представителей родов *Beggiatoa*, *Thioflexithrix* и *Azospirillum*. Выявлены метаболические пути диссимиляционного превращения соединений серы,  $H_2$ , метанола, а также путь ассимиляции CO<sub>2</sub> и N<sub>2</sub>.

Впервые показана способность к хемолитоавтотрофному росту для пресноводных представителей семейства *Beggiatoaceae*. Все исследованные бактерии способны к автотрофному росту за счет функционирования цикла Кальвина-Бенсона-Бассама. Выявлен тип рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы: РБФК у *T. psekupsensis* D3 относится к форме IAq, у *B. leptomitoformis* D-402 – к форме IC, а у *A. thiophilum* BV-S в геноме закодированы два типа РБФК: IC и IV.

Впервые показана способность к метилотрофному росту у представителя рода *Azospirillum - A. thiophilum*, выявлен путь превращения метанола (через тетрагидрометаноптериновый путь) и впервые показано, что ассимиляция  $C_1$ -соединений (CO<sub>2</sub>) для анаболизма при метилотрофном росте у *A. thiophilum* и *B. leptomitoformis* осуществляется через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама.

### Практическая значимость

Существенно расширен состав семейства *Beggiatoaceae*. Также расширены представления о метаболическом потенциале семейства *Beggiatoaceae* и рода

*Azospirillum*. Полученные данные позволяют скорректировать область применения этих организмов в биотехнологических процессах.

Исследованные штаммы бактерий могут использоваться в качестве биофильтра для очистки сточных вод от токсичных соединений серы и метанола.

Синтезируемые *T. psekupsensis* экзополисахариды (гликан) могут быть использованы в фармацевтике в качестве основ для изготовления лекарственных препаратов или в пищевой промышленности в качестве стабилизаторов или загустителей.

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

### Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных и российских конференциях и симпозиумах:

1) 10<sup>th</sup> International congress on extremophiles, Saint-Petersburg, Russia, 2014; 2) 19я международная пущинская школа-конференция молодых ученых "Биология наука XXI века", Пущино, Россия, 2015; 3) 5-й Всероссийский симпозиум с международным участием «Автотрофные микроорганизмы», Москва, Россия, 2015; 4) VIII Всероссийская конференция молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой», Саратов, Россия, 2016; 5) 7th FEMS Congress of European microbiologists, Valencia, Spain, 2017; 6) 1-й Российский микробиологический конгресс, Пущино, Россия, 2017; 7) 5th International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism, Vienna, Austria, 2018.

### Публикации

Материалы диссертации содержаться в 19 печатных работах: 10 экспериментальных статьях и 9 тезисах.

### Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложения.

Работа изложена на 165 страницах, включает 21 таблицу, 43 рисунка, список литературы из 274 наименований, из них 24 на русском и 250 на английском языке.

## Место проведения работы и благодарности

Работа была выполнена на кафедре биохимии и физиологии клетки Воронежского государственного университета.

Автор выражает глубокую признательность к.б.н. Белоусовой Е.В. за помощь в выделении чистой культуры *Thioflexithrix psekupsensis* D3, Фоменкову А.И. за помощь в получении геномных последовательностей, Тарлачкову С.В. за помощь в анализе геномов, Новикову А.А. и Копицыну Д.С. за помощь в хемотаксономическом анализе, к.б.н. Федоненко Ю.П. и Евстигнеевой С.С. за помощь в исследовании состава экзополисахаридов, д.х.н. Кузнецову В.А. за помощь в получении ЯМР-спектра, д.б.н. Дубининой Г.А. за помощь и консультации на всех этапах работы.

Работа была выполнена при финансировании в рамках грантов РФФИ № 15-04-03749, 16-34-01097, 18-04-00556.

Автор выражает особую благодарность д.б.н. Грабович М.Ю. за помощь в формулировании положений диссертации, полезные советы и поддержку на всех этапах работы.

# ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### Глава1. Бесцветные серобактерии

Бесцветные серобактерии распространены по всему миру в различных водоемах, которые могут существенно различаться по глубине, солености и Однако ЭТИ микроорганизмы всегда обитают температуре. В узких экологических нишах, эффективно конкурируя с химическим окислением сульфида, на границе раздела аэробной и анаэробной фаз (Jørgensen and Gallardo, 1999). Они образуют мощные маты на поверхности сульфидных отложений, где эффективно окисляют сульфид, предотвращая его поступление в толщу воды. Один из характерных признаков этой группы – внутриклеточное накопление элементной серы и часто крупные размеры клеток. Для получения энергии бесцветные серобактерии окисляют восстановленные соединения серы, а кислород и в ряде случаев нитраты используют в качестве акцептора электронов. Серобактерии усваивают углерод через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама или преобразуют органические соединения (Nelson and Jannasch, 1983).

Бесцветные серобактерии – это физиологическая, а не таксономическая группа. К ней традиционно относят представителей разных классов: бетапротеобактерии (Macromonas), гаммапротеобактерии (Achromatium, Thioploca, Thiothrix. Beggiatoa, Thiomargarita), эпсилонпротеобактерии (Thiovulum), бактерии с неясным таксономическим положением (Thiospira, Thiobacterium), а также консорциум "Thiodendron", состоящий из анаэробных спирохет и сульфидогенов, *Thiobacterium* и *Thiospira*. Все эти бактерии способны запасать сероводород и элементную серу внутриклеточно окислять В периплазме. Однако не для всех показана способность к литотрофному росту в присутствии восстановленных соединениях серы. Некоторые из этих бактерий окисляют сероводород по перекисному механизму (спирохеты из консорциума "Thiodendron" – Spirochaeta perfelievii, Thiospira, Macromonas bipunctata (Dubinina et al., 2011; Дубинина и Грабович, 1983; 1984; Дубинина и др., 2004),

для других механизм окисления сероводорода неизвестен (*Thiobacterium* (Grünke et al., 2010).

### 1.1. Проблемы классификации

Большинство бесцветных серобактерий, относящихся к классу гаммапротеобактерии, традиционно классифицировали в три семейства по морфологическим признакам: (1) *Beggiatoaceae*, содержащие роды *Beggiatoa*, *Thioploca* и *Thiomargarita* (Leadbetter, 1974; Strohl 1989); (2) *Leucotrichaceae*, содержащие *Leucothrix* и *Thiothrix* (Buchanan, 1957; Brock, 1974); и (3) *Achromatiaceae*, содержащие единственный род *Achromatium* (Van Niel, 1948).

В настоящее время стандартным подходом к оценке эволюционных взаимоотношений организмов является сравнение генетической информации. Наиболее известным геном для классификации и идентификации организма является ген малой рибосомальной субъединицы (ген 16S рРНК у бактерий и архей, 18S рРНК у эукариотических микроорганизмов), поскольку он считается универсальной и консервативной структурой, присутствующей во всех доменах жизни (Pace et al., 1986). К концу двадцатого столетия информация об этой филогенетической последовательности, наконец, стала доступна для некоторых крупных серных бактерий (Lane et al., 1992; Teske et al., 1995). Однако для многих морских представителей получение полноразмерных последовательностей генов 16S рРНК оставалось чрезвычайно сложным, и до недавнего времени для определенных групп были доступны только частичные последовательности (около 800 нуклеотидов) (Kalanetra et al., 2005; Schulz et al., 1999; Teske et al., 1995). Кроме того, многие попытки филогенетически идентифицировать крупные серные бактерии, которые были четко визуализированы в естественном образце, часто терпели неудачу с использованием стандартной процедуры приготовления библиотек (Angert et al., 1998; Gillan et al., 1998; Edgcomb et al., 2002; López-Garcí et al., 2003, Sekar et al., 2006; Stevens and Ulloa 2008). Недавно было обнаружено, что гены 16S рРНК большинства крупных серобактерий (Thiomargarita) значительно удлиняются из-за введения в ген нескольких длинных интронов. Эти более длинные гены не удается амплифицировать в

полимеразной цепной реакции, что может служить основной причиной сложного поиска филогенетической информации из этой группы (Salman et al., 2012). Для повышения качества последовательностей 16S рРНК некоторые исследователи получали их разными методами, например путем классического секвенирования по Сэнгеру и 454 РугоТаg (Aranda et al., 2015).

Имеющиеся в настоящее время методы построения дерева с использованием доступных последовательностей генов 16S рРНК крупных серных бактерий приводят к моделям, которые различаются по ветвлению на уровне рода. Следовательно, филогенетические деревья (Peplies et al., 2008) используются, чтобы показать только однозначно поддерживаемые предполагаемые эволюционные события, генерирующие монофилетические линии. В настоящее время они не обеспечивают достаточного разрешения, чтобы прояснить иерархический шаблон ветвления для разных родов в семействе Beggiatoaceae, чтобы дать более точные выводы об эволюционной и морфологической дифференциации. С другой стороны, секвенирование целых геномов является перспективным подходом к решению этого вопроса.

В настоящее время систематика бесцветных серобактерий подвергается пересмотру на основании генетической информации. В последнем издании определителя Берги, посвященном протеобактериям, большинство сероокисляющих гаммапротеобактерий были семейству отнесены к *Thiotrichaceae* (Garrity et al., 2005). В 2011 году была опубликована статья Salman et al., в которой указывалось, что эта реклассификация не основывается на филогенетических данных и противоречит правилу 51b Бактериологического кодекса (Lapage et al., 1992). Salman с соавторами предложили вернуть семейство Beggiatoaceae и включить в него роды, наиболее близкие к Beggiatoa (Thioploca, Thiomargarita), а также добавить в состав семейства девять новых видов входящих в семь новых родов со статусом *Candidatus*.

Совсем недавно была опубликована статья Boden и Scott (2018), в которой предлагается новая ревизия типового рода *Thiothrix* семейства *Thiotrichaceae*. Авторы предлагают отнести 4 вида, ранее входящие в состав рода *Thiothrix*, в два

14

новых рода: *Thiolinea* gen. nov. (*T. disciformis* и *T. eikelboomii*) и *Thiofilum* gen. nov. (*T. flexile* и *T. defluvii*), а также предлагают отнести эти роды в состав новых семейств: *Thiolinaceae* fam. nov. и *Thiofilaceae* fam. nov. Роды *Leucothrix* и *Cocleimonas* предлагается отнести к семейству *Leucotrichaceae*, а в составе семейства *Thiotrichaceae* оставить род *Thiothrix* с соответствующими изменениями.

До сих пор дискутируется вопрос о составе семейства *Thiotrichaceae*. Согласно Boden и Scott (2018), которые руководствуются последним изданием определителя Берги (Garrity et al., 2005), это семейство включает в себя род *Thiothrix*, и, как сложилось исторически, содержит роды Achromatium, *Thiobacterium*, *Thiomargarita*, *Thioploca* и *Thiospira*. И как пишут авторы, таксономическое положение последних 5 родов невозможно определить, учитывая недостаточность данных. Salman с соавторами (2011) настаивает на удаление из состава семейства *Thiotrichaceae* таких родов, как *Thiomargarita*, *Thioploca*, и включение их в состав семейства *Beggiatoaceae*. В статье Salman с соавторами (2013) род *Achromatium* авторы статьи рассматривают в составе семейства *Achromatiaceae*.

В настоящее время предложено построение новой таксономии прокариот на основе построения филогенетических деревьев по конкатенированным последовательностям 120 белков (Parks et al., 2018). Согласно ей, семейство *Beggiatoaceae* следует относить к отдельному порядку *Beggiatoales*. В состав семейства планируется включить рода *Beggiatoa, Marithrix, Thioflexithrix* и *Thioploca* (http://gtdb.ecogenomic.org/tree).

Таким образом, систематика бесцветных серобактерий до конца не завершена и продолжает развиваться. Целью данного обзора будет более подробное рассмотрение семейства *Beggiatoaceae*.

### 1.2. Морфотипы сероокисляющих бактерий из семейства Beggiatoaceae

Согласно последней таксономической ревизии, проведенной Salman et al. (2011), в состав семейства *Beggiatoaceae* входят три рода с валидно опубликованными названиями: *Beggiatoa*, *Thioploca* и *Thiomargarita*, а также

семь родов со статусом *Candidatus*: "*Ca*. Thiopilula", "*Ca*. Thiophysa", "*Ca*. Marithoploca", "*Ca*. Maribeggiatoa", "*Ca*. Isobeggiatoa", "*Ca*. Parabeggiatoa", "*Ca*. Marithrix". Позднее к этом уже семейству было отнесено еще два рода: "*Ca*. Allobeggiatoa" (Hinck et al., 2011) и "*Ca*. Halobeggiatoa" (Grünke et al., 2012).

В начале 2000-ых годов был проведен комплексный анализ всех имеющихся в настоящее время полноразмерных последовательностей генов 16S рРНК крупных серных бактерий и их морфологии. Было показано, что морфологические характеристики (одиночные образование клетки, свободноживущих прикрепленных нитей) или часто являются полифилетическими, то есть они проявляются, по меньшей мере, в двух филогенетических кластерах, отдельных которые не являются монофилетическими сестринскими группами, происходящими от одного и того же предка (Ahmad et al., 2006; Salman et al., 2011).

Наиболее интригующим примером этой морфологической двусмысленности является морфотип «свободноживущая, скользящая нить» (рис. 1) - морфотип, который на сегодняшний день является самым распространенным среди серобактерий (Soutar and Crill, 1977, Williams and Reimers, 1983; Nelson et al., 1989, Larkin and Henk, 1996, Jørgensen et al., 2010; de Albuquerque et al., 2010; Hinck et al., 2011; Grünke et al., 2011; McKay et al., 2012).



Рис. 1. Нити *Beggiatoa* с включениями элементной серы. Масштаб 20 мкм. Изображение из Microbial Diversity 1997 (Rolf Schauder)

16

Сравнение всех имеющихся в настоящее время последовательностей генов 16S pPHK этих бактерий выявляет разграничение на шесть различных родов: *Beggiatoa*, "*Ca*. Maribeggiatoa", "*Ca*. Parabeggiatoa", "*Ca*. Isobeggiatoa", "*Ca*. Halobeggiatoa", "*Ca*. Allobeggiatoa" плюс два дополнительных, еще не классифицированных филогенетических кластера (нити из белого мата в бассейне Гуаймас и из отложений Намибии) (Salman et al., 2013).

Морфотип «прикрепленная, нить, образующая розетки» также является полифилетическим (рис. 2).



Рис. 2. Фотография *Thiothrix lacustris* BL, формирующего розетку. Масштаб 10 мкм. (Chernousova et al., 2009)

Традиционно к этому морфотипу относят нити *Thiothrix* и *Leucothrix* из семейств *Thiotrichaceae* и *Leucotrichaceae*, но в последнее время широкие нити с подобной морфологией были зарегистрированы в различных морских отложениях (Kalanetra et al., 2004; Kalanetra and Nelson 2010; Grünke et al., 2012) и их последовательности генов 16S рРНК образовали отдельный кластер ("*Ca*. Marithrix spp."), связанный с семейством *Beggiatoaceae*, а не с *Thiotrichaceae* или *Leucotrichaceae*.

Еще один полифилетический морфотип - это «образующие пучок нити» (рис. 3).



Рис. 3. Фотография *Thioploca*. Масштаб 50 мкм. (https://alchetron.com/Thioploca)

Первоначально были открыты тонкие пресноводные нити, но позже также были обнаружены тонкие и широкие морские нити, образующие пучки

Филогенетически эти организмы группируются в два разных рода в семействе *Beggiatoaceae*; один кластер до сих пор содержит исключительно широкие нити из чилийского апвеллинга ("*Ca*. Marithioploca sp."), а другой содержит тонкие нити из морской, солоноватой и пресноводной среды (*Thioploca* spp.).

Большинство морфотипов, не образующих нити, также являются полифилетическими. Это дополнительно усложняется тем, что отдельные монофилетические кластеры могут содержать морфологически гетерогенные виды. Например, одиночные клетки встречаются у морфологически гомогенного вида "*Ca*. Thiophysa hinzei" или у морфологически гетерогенных видов *Thiomargarita namibiensis* или "*Ca*. Thiomargarita nelsonii" (рис. 4).



Рис. 4. Клетки *Thiomargarita namibiensis* с включениями элементной серы, соединенные в цепочку. Масштаб 55 мкм (https://alchetron.com/Thiomargarita).

### 1.3. Физиология сероокисляющих бактерий из семейства Beggiatoaceae

Сергей Николаевич Виноградский открыл бесцветные серобактерии в конце XIX века. Он использовал их в качестве модельного объекта для разработки концепции хемолитотрофии (Winogradsky, 1888). Это типичные градиентные организмы. Подвижные бактерии располагаются в горизонте, где встречаются окислитель И восстановитель неорганической природы (Winogradsky, 1887; Schewiakoff, 1892; Hinze, 1903; Nelson et al., 1982). Некоторые неподвижные свободноживущие одиночные клетки нуждаются в эпизодическом перемешивании осадка и клеток (Schulz et al., 1999; Kalanetra et al., 2005; Salman et al., 2011); другие клетки остаются сидячими, но испытывают динамические изменения в химическом составе донной воды и, как полагают, используют эти флуктуации как средство получения доноров и акцепторов электронов (Winogradsky 1888, Kalanetra et al., 2004; Bailey et al., 2011; Girnth et al., 2011).

Типичной физиологией представителей семейства *Beggiatoaceae* является окисление сульфида до сульфата при помощи кислорода или нитрата. При этом элементная сера образуется в виде промежуточного продукта и запасается внутриклеточно в периплазме (Winogradsky, 1887; Nelson and Jannasch, 1983).

Морские представители семейства обычно способны к литоавторофному росту на сульфиде (Nelson and Jannash, 1983; Nelson et al., 1989; Kalanetra and Nelson, 2010) факультативной автотрофии, или при которой также могут ассимилироваться органические соединения (Maier and Gallardo, 1984, Otte et al., 1999; Schulz and De Beer, 2002); предпочитают микроаэробные условия с разными иконцентрациями кислорода (Nelson et al., 1982, Williams and Reimers, 1983, Maier and Gallardo, 1984, Schulz et al., 1999). Пресноводные штаммы более толерантны к кислороду, а некоторые могут расти полностью гетеротрофно (Larkin and Shinabarger, 1983; Strohl and Larkin, 1978). Некоторые крупные серные бактерии могут восстанавливать нитрат либо до аммиака (McHatton et al., 1996; Sayama et al., 2005; Schulz and Jørgensen, 2001, Otte et al., 1999), либо до газообразного азота (McHatton et al., 1996; Mussmann et al., 2007).

Отдельные клетки, диаметр которых превышает 4-5 мкм, обычно содержат внутренние вакуоли. Если размер клетки составляет около 10 мкм, в ней содержится несколько небольших вакуолей, а также включения элементной серы и такие запасающие вещества, как полифосфат и поли-β-гидроксиалканоаты (Strohl and Larkin, 1978; De Albuquerque et al., 2010; Brock et al., 2012; Hinck et al., 2011). Более крупные клетки (от нескольких десятков до сотен микрометров в диаметре), дополнительно имеют большую центральную вакуоль, заполненную жидкостью, которая отличается по химическому составу от цитоплазмы и может содержать нитрат в высоких концентрациях (мМ) (Gallardo, 1977; Nelson et al., 1989; Fossing et al., 1995; Schulz et al., 1999; Kalanetra et al., 2004). Эта внутренняя компартментализация уменьшает цитоплазматический слой примерно до 2 мкм на периферии клетки, что в значительной степени устраняет ограничения по диффузии питательных веществ, встречающихся при больших клеточных объемах (Schulz and Jørgensen, 2001). Недавно было высказано предположение, что вакуолярная мембрана также активно используется для превращения энергии за счет транспорта протонов при восстановлении нитратов (Beutler et al., 2012).

20

### 1.4. Культивирование представителей семейства Beggiatoaceae

В жидкой культуре существуют несколько миксотрофных пресноводных штаммов Beggiatoa и Thiothrix, не образующих вакуоли (Strohl and Larkin, 1978, Strohl et al., 1981, Larkin and Shinabarger, 1983), но, несмотря на многочисленные попытки, ни один морской представитель крупных серобактерий, имеющих вакуоли, еще не был успешно культивирован в лаборатории, не говоря уже о выделении чистой культуры. После разработки градиентных культур были успешно выделены два морских литотрофных штамма *Beggiatoa*, не содержащих вакуоли (MS-81-1с и MS-81-6; Nelson and Jannasch, 1983); однако они были утеряны и больше не доступны. В настоящее время только один морской литотрофный штамм, Beggiatoa sp. 35Flor, поддерживается в градиентной культуре. Этот штамм содержит несколько небольших вакуолей, не содержит нитратов, но содержит большое количество полифосфата, и растет в совместной культуре с гетеротрофным штаммом *Pseudovibrio* sp. (Kamp et al., 2008; Brock et al., 2012; Schwedt et al., 2012). Для других морфотипов крупных серобактерий, таких как нити, собранные в пучки, или любые типы серных бактерий, не формирующих нити, ни один подход к обогащению еще не позволил стабильно выращивать клетки в течение длительного времени.

Интересно, что градиентная среда, разработанная Нельсоном и Яннашем (1983), неоднократно позволяла получать накопительную культуру скользящих нитчатых серобактерий, которые, на основании их последовательностей генов 16S pPHK, относились только к одной филогенетической подгруппе семейства *Beggiatoaceae*: базальному кластеру семейства (кластер «XII», Salman et al., 2011), который включает в себя *Beggiatoa alba*, штаммы MS (Nelson et al., 1982; Nelson and Jannasch, 1983), штамм 35Flor (Brock et al., 2012), накопительную культуру Araruama (De Albuquerque et al., 2010) и накопительные культуры из гиперсоленых сред, классифицированных как род "*Ca*. Allobeggiatoa spp." (Hinck et al., 2011).

### 1.5. Экология представителей семейства Beggiatoaceae

Представители семейства *Beggiatoaceae* являются типичными обитателями сульфидных сред, таких как богатые органическими веществами пресноводные отложения (Winogradsky, 1887, Keil, 1912, Strohl and Larkin, 1978; Mezzino et al., 1984; Sweerts et al., 1990), прибрежные евтрофные зоны (Jørgensen, 1977, Sayama, 2001), высокопродуктивные области апвеллинга (Gallardo, 1977; Schulz et al., 1999), места выхода гидротермальных вод (Prince et al., 1988; Jannasch et al., 1989; de Beer et al., 2006; Kalanetra et al., 2004), продуктивные цианобактериальные маты в озерах и лагунах (Garcia-Pichel et al., 1994; Hinck et al., 2007, 2011) и активный ил (Farquhar and Boyle, 1971). Места обитания представителей семейства *Beggiatoaceae* перечислены в таблице 1.

Эти микроорганизмы образуют маты на поверхности или в пределах верхних сантиметров сульфидных осадков. Они используют сульфид, который либо диффундирует вверх из основной зоны восстановления сульфата, либо поступает в водоем со сточными водами. Элементная сера хранится в виде глобул в периплазматическом пространстве и служит резервным источником энергии. Исследования по экологии серобактерий и их генетическому потенциалу выявили приспособления к сульфидным, кислородным, нитратным и температурным градиентам (Kojima and Fukui, 2003; Heijs et al., 2005; Grünke et al., 2011, 2012; McKay et al., 2012; MacGregor et al., 2013a).

Таблица 1. Местообитания представителей семейства Beggiatoaceae

Представитель	Условия местообитания	Географическое положение	Ссылки
семейства		местообитания	
Thiomargarita	Верхние слои (несколько см) богатого органическими веществами диатомового ила, метановые источники, гидротермальные системы	Различные морские отложения по всему миру	Schulz et al., 1999; Kalanetra et al., 2005; Bailey et al., 2011; Grünke et al., 2011; Salman et al., 2011
Thioploca	Морские, солоноватые или пресноводные водоемы	Евразия, Америка, Япония и их побережья	Wislouch, 1912; Koppe, 1922; Kolkwitz, 1955; Maier & Preissner, 1979; Maier & Murray, 1965; Nishino <i>et al.</i> , 1998; Kojima <i>et al.</i> , 2007; Dermott & Legner, 2002; Земская и др., 2001, 2009; Høgslund et al., 2010
"Candidatus Marithioploca"	Прибрежный апвеллинг	Побережье Чили	Salman et al., 2013
"Candidatus Thiopilula"	Морские отложения с минимальным содержанием кислорода, морские глубоководные холодные источники	Побережье Намибии, Баренцево море, побережье Барбадоса	Salman et al., 2011; Grünke et al., 2012; Jones et al., 2015
<i>"Candidatus</i> Thiophysa"	Морские воды	Неаполитанский залив	Hinze, 1903; Salman et al., 2011
"Candidatus Maribeggiatoa"	Глубоководные осадки в районе гидротермальных источников	Морские мангровые отложения в Карибском бассейне, залив Гуаймис на побережье Мексики	MacGregor <i>et al.</i> , 2013a, 2013b; Jean et al., 2015
"Candidatus Isobeggiatoa"	В прибрежных морских отложениях	Фьорд на южном побережье Чили, морские мангровые отложения в Карибском бассейне	Mussmann <i>et al.</i> , 2007; Aranda et al., 2015; Jean et al., 2015
" <i>Candidatus</i> Parabeggiatoa"		Фьорд на южном побережье Чили	Mussmann <i>et al.</i> , 2007; Aranda et al., 2015

"Candidatus	Микробные маты из гиперсоленых	город Герреро-Негро	Hinck et al., 2011
Allobeggiatoa"	источников	(Мексика), остров Ибица,	
		остров Форментера, озеро	
		Чипрана (Испания)	
"Candidatus	Микробные маты из гиперсоленых	город Герреро-Негро	Hinck, 2008
Halobeggiatoa"	источников	(Мексика)	
"Candidatus	Глубоководные морские микробные маты	Грязевой вулкан в	Salman-Carvalho et al., 2016,
Marithrix"	в местах выхода холодного и горячих	Мексиканском заливе, Уайт	Kalanetra et al., 2004, Heijs et al.,
	источников	Пойнт (Калифорния, США),	2005, Kalanetra and Nelson, 2010,
		Миланский грязевой вулкан	Grünke et al., 2012
		(восточное Средиземное	
		море), хребет Хуан де Фука,	
		Баренцево море	
Beggiatoa	Морские, пресноводные и солоноватые	Россия, США, Баренцево море,	Mezzino et al., 1984, Dubinina et al.,
	воды	юго-восточная Индия	2017, de Albuquerque et al. 2010,
			Grünke et al., 2012, Nelson et al. 1982,
			Saravanakumar et al. 2012, Teske and
			Salmam, 2014

### Глава 2. Метаболизм представителей семейства Beggiatoaceae

### 2.1. Серный метаболизм у представителей семейства Beggiatoaceae

### 2.1.1. Окисление сульфида

Сульфид окисляется всеми изученными ранее представителями семейства Beggiatoaceae (например, Beggiatoa alba B15LD, B18LD; Beggiatoa sp. B25RD, L1401-15, OH-75-2a, OH-763-B, MS-81-1c, MS-81-6, 35Flor; Thiomargarita spp., "Ca. Marithioploca spp.") (Mezzino et al., 1984; Nelson and Castenholz, 1981; Nelson et al., 1982; Nelson and Jannasch, 1983; Hagen and Nelson, 1996; Otte et al., 1999; Schulz and de Beer, 2002; Kamp et al., 2008; Flood et al., 2016; Winkel et al., 2016). Поэтому ожидается, что сульфидокисляющие ферменты встречаются у всех представителей семейства. Сульфидокисляющие флавопротеины были обнаружены во всех секвенированных геномах представителей семейства Beggiatoaceae (Kreutzmann, 2013; Mussmann et al., 2007; MacGregor et al., 2013; Flood et al., 2016; Salman-Carvalho et al., 2016). Практически во всех геномах было идентифицировано несколько (до четырех) гомологов генов, кодирующих сульфидокисляющие ферменты. Согласно недавно предложенной схеме классификации (Marcia et al., 2010; Gregersen et al., 2011) предсказанные сульфидокисляющие флавопротеины представителей семейства Beggiatoaceae могут быть идентифицированы как сульфид:хинон оксидеродуктазы (SQR) типа I (SqrA) и типа VI (SqrF) и субъединицы флавопротеинов (FccB) флавоцитохром с-сульфиддегидрогеназ (FCSD). Только в геноме "Candidatus Marithrix" имеется ген второй субъединицы флавоцитохрома с – *fccA*. Ферменты всех трех типов кодируются в геномах *Beggiatoa alba* B18LD и филаментов Guaymas. В других изученных драфт-геномах было идентифицировано хотя бы по одному гену ферментов окисления сульфида (SqrA и FccB в "Candidatus Isobeggiatoa sp."; SqrF и FccB в Beggiatoa sp. 35Flor и "Ca. Thiomargarita nelsonii"; FccB в "Ca. Parabeggiatoa sp."). Такое распределение и монофилетическая кластеризация большинства последовательностей SqrA, SqrF и FccB у представителей семейства Beggiatoaceae показывает, что все три типа сульфидокисляющих флавопротеинов могли быть унаследованы от общего предка семейства и

поэтому в геноме может быть закодировано несколько гомологов одновременно. Две последовательности FccB, BA02 147 из *Beggiatoa alba* B18LD и BOGUAY 2853 из филаментов Гуаймас, филогенетически значительно отличались от других последовательностей FccB представителей семейства *Beggiatoaceae* и, таким образом, были, вероятно, получены путем горизонтального переноса генов (Kreutzmann, 2013).

Биохимические эксперименты с *Beggiatoa alba* B18LD, выращенной в присутствии 200 мкМ сульфида (Schmidt et al., 1987) показали, что ферменты SQR типа являются основными ферментами, катализирующими окисление сульфида в этом штамме. Учитывая свойства охарактеризованных ферментов SQR типов - SqrA и SqrF, представляется вероятным, что они осуществляют окисление сульфидов при разных концентрациях сульфида в окружающей среде. Все известные в настоящее время ферменты SqrA проявляли высокое сродство к сульфиду - значения Km были представлены в микромолярном диапазоне (Arieli et al., 1994; Schütz et al., 1997; Bronstein et al., 2000; Nübel et al., 2000; Griesbeck et al., 2002; Wakai et al., 2007) и, по-видимому, ответственны за окисление низких концентраций сульфида. Показано, что единственный изученный фермент SqrF имеет решающее значение для роста только при высоких концентрациях сульфида (≥ 6 мM, Chan et al., 2009). Таким образом, каждый тип фермента функционирует при своей концентрации сульфида (Kreutzmann, 2013).

### 2.1.2. Окисление элементной серы

Как и другие запасающие серу бактерии, члены семейства *Beggiatoaceae*, по-видимому, окисляют элементную серу при участии обратной диссимиляционной сульфитредуктазы (rDSR). Гены dsrAB, кодирующие каталитические субъединицы rDSR, или их фрагменты были идентифицированы в драфт-геномах *Beggiatoa* sp. 35Flor, "*Ca*. Isobeggiatoa sp.", нити Гуаймас и "*Ca*. Thiomargarita nelsonii", "*Ca*. Marithrix" (Mußmann et al., 2007; MacGregor et al., 2013; Winkel et al., 2013; Flood et al., 2016; Salman-Carvalho et al., 2016). Метатранскриптомный анализ показал экспрессию гена *dsrA* в пробах, содержащих нити "*Ca*. Thiopilula", однако не выявил экспрессии генов *dsrB* и

dsrC (Jones et al., 2015). Кроме того, полные или почти полные комплексы генов dsr (dsrABCEFHLMKJOPN) (Sander et al., 2006; Grimm et al., 2008) содержатся в секвенированных драфт-геномах *Beggiatoa* sp. 35Flor, "*Ca.* Isobeggiatoa sp." (Mussmann et al., 2007) и нитях, выделенных из залива Гуаймас (MacGregor et al., 2013). В отличие от *Allochromatium vinosum*, пурпурной серной бактерии, на примере которой был изучен путь rDSR (Dahl et al., 2005), гены *dsr Beggiatoaceae*, по-видимому, не образуют единого кластера. Вместо этого они распределены по нескольким локусам, и их расположение не строго повторяется, хотя сходство между разными геномами очевидно.

Способность окислять накопленную элементную серу до сульфата была одним из центральных аспектов первоначального физиологического описания рода *Beggiatoa* Виноградским (1887). Экспериментальное подтверждение полного окисления серы впоследствии было получено путем определения накопления сульфата во время инкубации в присутствии восстановленных соединений серы (*Beggiatoa* sp. OH-75-2a, *Beggiatoa* sp. D-402 и "*Ca*. Marithioploca spp.") (Nelson и Castenholz, 1981; Otte et al., 1999; Грабович, 2005), а также соотношения кислород/сульфид и подкисления сред, предположительно, из-за образования серной кислоты (*Beggiatoa* sp. MS-81-6; Nelson et al., 1986). Точно также концентрация внутриклеточного сульфата, превышающая внешние уровни до трех порядков, была в значительной степени свидетельством того, что сульфат является конечным продуктом окисления соединений серы (*Thioploca* spp., *Beggiatoa* sp. 35Flor) (Kojima et al., 2007; Berg et al., 2014).

Однако для некоторых членов семейства *Beggiatoaceae*, таких как штаммы *Beggiatoa alba* B18LD и B15LD, не была показана способность к окислению серы (Schmidt et al., 1987). Гены *dsrAB* не были обнаружены в геноме B18LD (Kreutzmann, 2013) и их не удалось амплифицировать со специфическими праймерами (Loy et al., 2009) для любого из двух штаммов. Тем не менее окисление серы через rDSR-путь является, скорее всего, наследственной чертой *Beggiatoaceae*, о чем свидетельствует монофилетическая кластеризация белков rDsrB из отдаленных представителей семейства (Kreutzmann, 2013). Имеющиеся

27

в геноме B18LD гены кластера rDSR (например, *dsrCEFHMKJ*) могут быть просто реликтами, или же кодируемые ими белки могут быть вовлечены в перенос серы или электронов в других метаболических процессах. Последний факт был проверен для белка DsrC из *Allochromatium vinosum*. Даже для штамма, выращенного хемогетеротрофно, удаление гена *dsrC* приводило к летальным последствиям (Cort et al., 2008). На самом деле, множественные гены, кодирующие гомологи DsrC, были идентифицированы в геномах *Beggiatoa* sp. 35Flor, "*Ca*. Isobeggiatoa sp." (Mussmann et al., 2007), "*Candidatus* Thiomargarita nelsonii" (Winkel et al., 2013) и в геноме нитей из залива Гуаймас (MacGregor et al., 2013).

Таким образом, механизм окисления серы до сульфита у представителей семейства *Beggiatoaceae* до сих пор до конца не ясен.

#### 2.1.3. Окисление сульфита

Окисление сульфита до сульфата прокариотами может протекать через два альтернативных пути: прямой и непрямой. Сульфитдегидрогеназы из семейства сульфитоксидазы были предложены для катализа прямого окисления сульфита. Этот путь, по-видимому, более распространен, и почти все прокариоты, которые могут окислять сульфит только через один из двух путей, используют прямой (Kappler and Dahl, 2001). Соответственно, все ранее протестированные штаммы Beggiatoaceae были способны непосредственно окислять сульфит (MS-81-1с, MS-81-6, OH-75-2a и D-402, Hagen and Nelson, 1997; Grabovich et al., 2001). Однако ген, кодирующий известный непосредственно сульфитоокисляющий фермент, периплазматическую сульфит: феррицитохром-с-оксидоредуктазу типа SorAB (Kappler et al., 2000), был идентифицирован только в геноме нитей, выделенных из залива Гуаймас (MacGregor et al., 2013). Гены, кодирующие субъединицу SorA, также были идентифицированы в геноме Thiomargarita BudS10 (Flood et al., 2016). Гомологи YedY, которые также относятся к семейству ферментов сульфитоксидазы (Kappler, 2011), кодируются Beggiatoa sp. 35Flor, Beggiatoa alba B18LD и "Ca. Isobeggiatoa sp.". Однако фермент YedYZ E. coli не участвует в окислении сульфита. Вместо этого он функционирует как редуктаза неизвестного типа (Loschi et al., 2004). Соответственно, остается неясным, является ли сульфитдегидрогеназа типа SorAB или какой-либо другой фермент ответственным за прямое окисление сульфита у большинства членов семейства *Beggiatoaceae*.

В 2012 году появилось сообщение об участии гетеромерного мембрансвязанного комплекса под названием SoeABC (сульфитоокисляющий фермент) органосульфонат-разлагающей окислении сульфита цитоплазме B В хемотрофной альфапротеобактерии Roseobacter (Lehmann et al., 2012). Белок SoeABC, по-видимому, является составной частью сложных железосерных молибдопротеинов и состоит из NrfD / PsrC-подобной мембрансвязанной субъединицы (SoeC) и двух цитоплазматических субъединиц: железосерного белка (SoeB) и молибдопротеина с N-терминальным железосвязывающим сайтом (SoeA). Следует отметить, что SoeABC и периплазматические сульфитдегидрогеназы Sor-типа относятся к совершенно различным семействам молибдоэнзимов. SorA родственники белкам И его относятся к сульфитоксидазам, которые связывают немодифицированный молибдоптерин. SoeA попадает в суперсемейство белков МорВ, связывающех молибдоптерин, модифицированный присоединения ΓМΦ путем ковалентного (гуанозинмонофосфат) или ЦМФ (цитидинмонофосфат) (Dahl et al., 2013). Белки из семейств Soe и Sor не обнаруживают значительных гомологий, хотя внутри семейства наблюлается белковых каждого значительное сходство последовательностей (Kisker et al., 1998). Гены, кодирующие белки, связанные с SoeABC, присутствуют как в пурпурных, так и в зеленых серных бактериях, и в последние годы неоднократно предполагалось их участие в окислении сульфита, генерируемого системой Dsr в цитоплазме (Frigaard & Bryant, 2008; Frigaard & Dahl, 2008). Для представителей семейства Beggiatoaceae окисление сульфита при помощи SoeABC пока не было показано, однако это один из потенциально возможных путей.

В случае непрямого пути окисления сульфита осуществляется ряд последовательных реакций. В первой реакции сульфит реагирует с АМФ под

29

действием АФС-редуктазы, в результате чего образуется АФС и выделяется 2 электрона. Далее АФС расщепляется с высвобождением сульфата, что сопровождается фосфорилированием на уровне субстрата. Эта реакция может катализироваться одним из двух ферментов: АТФ-сульфурилазой (ЕС 2.7.7.4; Renosto et al., 1991), которая обменивает связанный с АМФ сульфат на свободный пирофосфат, давая один АТФ на сульфат; или АФС: фосфатаденилаттрансферазой (АФАТ, ранее известный как АДФ-сульфурилаза; ЕС 2.7.7.5), которая использует ортофосфат в качестве замены сульфата, высвобождая АДФ. АДФ-сульфурилаза дает 1/2 АТФ на окисленный сульфит. АДФ-сульфурилаза до сих пор в основном обнаруживалась в штаммах, которые одновременно содержали также более энергоэффективную АТФ-сульфурилазу, сродство обоих ферментов к АФС показал, что взаимодействие с a пирофосфатом обычно является более предпочтительным (Peck, 1960; Dahl and Trüper, 1989; Brüser et al., 2000). По сравнению с прямым окислением сульфита непрямое окисление сульфита, представляющий собой двухстадийный процесс, запасает дополнительную энергию путем субстратного фосфорилирования.

Непрямой, АМФ-зависимый путь окисления сульфита был выявлен у облигатно хемолитоавтотрофного штамма *Beggiatoa* sp. MS-81-1с и отсутствовал у факультативно хемолитоавтотрофных или миксотрофных штаммов MS-81-6, OH-75-2a и D-402 (Hagen and Nelson, 1997; Grabovich et al., 2001).

Примечательно, что штамм MS-81-1с, окисляющий сульфит по непрямому пути, способен продуцировать примерно вдвое большее количество сухого веса на единицу окисленного сульфита по сравнению со штаммом MS-81-6, использующим прямой путь окисления сульфита (Hagen and Nelson, 1997). Гены aprBA, кодирующие субъединицы АФС-редуктазы, удалось не амплифицировать соответствующими праймерами ИЗ факультативно С хемолитоавтотрофных или миксотрофных штаммов B18LD, D-401 и D-402 (Meyer and Kuever, 2007). Однако эти гены были идентифицированы в геномах "Ca. Isobeggiatoa sp.", "Ca. Tiomargarita nelsonii", нитей Guaymas, "Ca. Marithrix", что подтверждает предположение о гетерогенности сульфитного метаболизма в

семействе *Beggiatoaceae* (Mussmann et al., 2007; MacGregor et al., 2013; Winkel et al., 2013; Flood et al., 2016; Salman-Carvalho et al., 2016).

На филогенетических деревьях, построенных по белкам AprBA сероокисляющих прокариот, четко выделяются два глубоких филогенетических кластера, линия Apr I и линия Apr II. Причем белки линии Apr II (*Chlorobiaceae* и другие) имеют более высокое сродство с ферментами сероредукторов (Meyer and Kuever, 2007). Филогенетически белки AprA представителей семейства *Beggiatoaceae* принадлежат к линии Apr II, внутри которой они образуют монофилетический кластер (Kreutzmann, 2013).

При работе АФС-редуктазы сульфит реагирует с АМФ с образованием АФС и при этом высвобождаются электроны ( $SO_3^{2-} + AM\Phi = A\PhiC + 2\bar{e}$ ), которые передаются на пул хинонов посредством мембрансвязанной оксидоредуктазы (Qmo). Обычно комплекс генов QmoABC закодирован совместно с генами АФС-редуктазы (Pires et al., 2003; Zane et al., 2010; Rodriguez et al., 2011; Ramos et al., 2012).

Во всех *аргВА*-положительных геномах *Beggiatoaceae* были обнаружены гены *qmoAB*. Однако гены, кодирующие трансмембранную субъединицу, взаимодействующую с хиноном, QmoC или HdrE, не были обнаружены. Примечательно, что такие гены также отсутствует в других бета- и гаммапротеабактериях, содержащих Apr II (Meyer and Kuever, 2007). Отсутствие трансмембранного белка, взаимодействующего с хиноном, ставит вопрос о том, как комплекс Qmo и, в конечном счете, AФC-редуктаза этих организмов взаимодействуют с электронтранспортной цепью. Либо электроны не взаимодействуют с пулом хинонов, а вместо этого восстанавливают неизвестный цитоплазматический акцептор, либо предполагаемый комплекс QmoAB взаимодействует с другим трансмембранным белком (Kreutzmann, 2013).

Гены или фрагменты генов, кодирующие АТФ-сульфурилазу (*sat* или *sopT*), второй фермент АФС-зависимого пути, были идентифицированы во всех вышеупомянутых *aprBA*-позитивных геномах *Beggiatoaceae* и в геноме *Beggiatoa* sp. 35Flor. Для последнего штамма остается неясным, кодируются ли

отсутствующие ферменты АФС-зависимого пути диссимиляционного окисления сульфита или же идентифицированная АТФ-сульфурилаза функционирует в ассимиляционных процессах. В поддержку последнего варианта говорит тот факт, что гены всех остальных ферментов ассимиляционного пути восстановления сульфата были найдены в геноме *Beggiatoa* sp. 35Flor (Kreutzmann and Schulz-Vogt, 2016).

С использованием метода саузерн-блоттинга у штамма *Beggiatoa* sp MS-81-1с был идентифицирован ген, кодирующий диссимиляционную ATФсульфурилазу, в то время как у *Beggiatoa* sp. OH-75-2a выявить данный ген не удалось (Laue and Nelson, 1994). Была отмечена высокая активность ATФсульфурилазы для AФС-редуктазаположительного штамма MS-81-1c, но для штаммов MS-81-6 и OH-75-2a, которые окисляют сульфит исключительно через прямой путь, активность ATФ-сульфурилазы не была обнаружена (Hagen and Nelson, 1997). Ген (*apt*), кодирующий альтернативный сульфатобразующий фермент - AДФ-сульфурилазу (AФAT), не был идентифицирован ни в одном из проанализированных геномов *Beggiatoaceae*, а также ранее не было обнаружено соответствующей ферментативной активности в штаммах *Beggiatoa* (MS-81-1c, MS-81-6, OH- 75-2a) (Hagen and Nelson, 1997).

Таким образом, окисление сульфита у представителей семейства *Beggiatoaceae* может осуществляться по прямому пути сразу до сульфата или по непрямому пути с образованием промежуточного продукта АФС. Причем не у всех бактерий, содержащих в геноме гены АФС-редуктазы, были выявлены гены АТФ-сульфурилазы, поэтому не понятно, способны ли они окислять сульфит по непрямому пути.

### 2.1.4. Пути окисления тиосульфата

Тиосульфат у прокариот может окисляться тремя разными путями. Это прямой Sox-путь, в ходе которого ферментативный комплекс SoxAXBYZCD окисляет тиосульфат до сульфата, разветвленный Sox-путь (ферментативный комплекс SoxAXBYZ окисляет тиосульфат до сульфата и элементной серы) и тиосульфатдегидрогеназа, окисляющая тиосульфат до тетратионата.

Известно, что некоторые штаммы семейства Beggiatoaceae способны окислять тиосульфат (например, Beggiatoa alba B15LD, B18LD, Beggiatoa sp. B25RD, L1401-15, OH-75-2a, MS81-c, MS-81-6, D-402) (Güde et al., 1981; Nelson and Castenholz, 1981; Nelson and Jannasch, 1983; Mezzino et al., 1984; Hagen and Nelson, 1996; Мунтян и др., 2005). Появление включений серы при росте на тиосульфате однозначно указывает на то, что эти штаммы потребляют тиосульфат через разветвленный путь окисления тиосульфата (Hensen et al., 2006; Grimm et al., 2008; Kappler and Maher, 2013). Реакции этого пути сильно различаются для двух атомов серы, входящей в состав тиосульфата, сульфоновой серы (степень окисления +5) и сульфановой серы (степень окисления -1), которые окисляются до сульфата и элементной серы, соответственно (Smith and Lascelles, 1966; Trüper and Pfennig, 1966, Kappler and Maher, 2013). При использовании разветвленного пути окисления тиосульфата ожидается соотношение образующихся серы и сульфата 1: 1. Было обнаружено, что культура *Beggiatoa* sp. OH-75-2a образует элементную серу и сульфат в эквимолярных количествах при выращивании на тиосульфате (Nelson and Castenholz, 1981).

B соответствии с приведенными выше наблюдениями были идентифицированы гены, кодирующие большинство ферментов, вовлеченных в разветвленный путь окисления тиосульфата, то есть SoxA, SoxYZ и SoxB, в геномах *Beggiatoa* sp. 35Flor, "*Ca.* Isobeggiatoa sp." (Mussmann et al., 2007), нить Гуаймас (MacGregor et al., 2013) и *Beggiatoa alba* B18LD, *Thiomargarita* BudS10 (Flood et al., 2016), "Ca. Marithrix" (Salman-Carvalho et al., 2016). Фрагменты генов *soxY* и *soxB* были обнаружены в геноме "*Ca*. Thiomargarita nelsonii" (Winkel et al., 2016). Отдельные гены, кодирующие SoxX, вторую субъединицу белка SoxAX, не были обнаружены ни у одного из представителей семейства Beggiatoaceae (Kappler and Maher, 2013). Однако идентифицированные белки SoxA имеют N-концевую последовательность длиной примерно 150-200 аминокислот, которая демонстрирует значительное сходство с SoxX и обеспечивает дополнительный сайт связывания гема (СХХСН) подобно SoxX. Поиск в базе данных идентифицировал аналогичные последовательности только

в SoxA-белках Halorhodospira halophila (YP 001003514) и Bradyrhizobium *japonicum* (WP 018321809). Таким образом, гены, кодирующие SoxA и SoxX, как представляется, слиты у представителей Beggiatoaceae, H. halophila и B. *japonicum*, и это слияние представляет собой исключение среди изученных ранее SoxAX-белков. Филогенетический анализ гибридных белков SoxA показал, что все последовательности, полученные из Beggiatoaceae, тесно связаны и, вероятно, были унаследованы от общего предка семейства (Kreutzmann, 2013). Примечательно, что SoxА-домен слитого белка Н. halophila SoxAX идентифицирован как ближайший родственник доменных последовательностей SoxA, полученных из *Beggiatoaceae*. Биохимических данных, подтверждающих функцию специфических слитых белков SoxAX при окислении тиосульфата, на сегодняшний день нет. Тем не менее, представляется вероятным, что здесь идентифицированные белки SoxAXYZB представляют собой ферментативную систему, ответственную за окисление тиосульфата через разветвленный путь окисления тиосульфата у представителей *Beggiatoaceae*.

При функционировании прямого пути окисления тиосульфата с участием SoxCD не происходит внутриклеточного отложения элементной серы. Внутриклеточное отложение элементной серы представителями семейства *Beggiatoaceae* и отсутствие генов *soxCD* во всех отсеквенированных геномах являются подтверждением невозможности функционирования прямого Sox-пути для данного семейства (Mussmann et al., 2007; MacGregor et al., 2013; Salman-Carvalho et al., 2016). Фермент SoxCD представляет собой серо (сульфан) дегидрогеназу, наличие которой позволяет осуществлять полное и прямое окисление тиосульфата до сульфата через систему Sox (Friedrich et al., 2001, 2005).

Третий путь окисления тиосульфата – это последовательное его окисление до тетратионата, сульфита и сульфата (Ghosh and Dam, 2009). Образование тетратионата при окислении тиосульфата мало изучено в *Beggiatoaceae*. Биологическое окисление тиосульфата до тетратионата катализирует фермент тиосульфатдегидрогеназа. Недавно были идентифицированы гены, кодирующие различные типы этого фермента (Müller et al., 2004; Denkmann et al., 2012).

Гомолог тиосульфатдегидрогеназы из Allochromatium vinosum (TsdA) (Denkmann и др., 2012) был обнаружен в геноме "Ca. Isobeggiatoa sp.", а его усеченная, повидимому, нефункциональная версия была обнаружена в геноме "Са. Thiomargarita nelsonii" (THI516 0) (Kreutzmann, 2013). Сравнение с изученными тиосульфатдегидрогеназами типа TsdA (Denkmann et al., 2012) показало, что все консервативные и, вероятно, функционально важные остатки присутствуют в белке, кодируемом "Ca. Isobeggiatoa sp.", позволяя ему функционировать в качестве тиосульфатдегидрогеназы. Ген, кодирующий фермент катализирующий тетратионатгидролазу, превращение тетратионата ДО сульфита, до сих пор не идентифицировался ни в одном из проанализированных геномов Beggiatoaceae. Аналогичным образом, физиологические исследования не проводились, и остается открытым вопрос, способны ли члены Beggiatoaceae окислять тетратионат дальше (Kreutzmann, 2013).

Вместе эти данные свидетельствуют о том, что Beggiatoaceae в целом могут окислять тиосульфат через два пути, разветвленный путь окисления тиосульфата и, возможно, путь с интермедиатом тетратионатом. Разветвленный путь окисления тиосульфата, по-видимому, широко распространен среди членов этого семейства, если судить по обычному накоплению включений серы при окислении тиосульфата. Напротив, общность и важность пути с интермедиатом тетратионатом в настоящее время не могут быть оценены. Однако штаммы, которые, по-видимому, способны окислять тиосульфат через тетратионат ("Са. Isobeggiatoa sp."), также, вероятно, могут использовать разветвленный путь окисления тиосульфата (SoxAXBYZ). Таким образом, два пути могут функционировать у одних и тех же представителей семейства Beggiatoaceae, катализируя окисление тиосульфата в различных условиях окружающей среды. Физиологические исследования пурпурной серной бактерии Allochromatium vinosum показали, что окисление тиосульфата по разветвленному пути преобладает при значениях рН выше 7,0, тогда как путь с интермедиатом тетратионатом доминирует при нейтральном и кислом pH (Smith and Lascelles, 1966; Hensen et al., 2006). Тем не менее окисление тиосульфата может быть не универсальной чертой Beggiatoaceae, о чем свидетельствует отсутствие такой

активности в нескольких пресноводных штаммах (*Beggiatoa* sp. OH-763-B, OH-765-B, OH-766-B, OH- 767-B) (Nelson and Castenholz, 1981; Nelson et al., 1982). До сих пор окисление тиосульфата также не было показано для *Beggiatoa* sp. 35Flor, хотя этот штамм кодирует все компоненты комплекса SoxAXYZB (Kreutzmann, 2013).

### 2.2. Автотрофия у представителей семейства Beggiatoaceae

Представители семейства *Beggiatoaceae* охватывают метаболический диапазон от облигатной хемолитоавтотрофии в присутствии серных соединений до гетеротрофного или миксотрофного роста. Представителей семейства, способных к автотрофному росту, можно отнести к двум группам (Teske and Salman, 2014):

1. Автотрофные морские и пресноводные штаммы с тонким диаметром нитей, не содержащие вакуолей. Представлены факультативно автотрофным штаммом MS-81-6, облигатно автотрофным штаммом MS-81-1c (Nelson et al., 1982; Nelson and Jannasch 1983, Nelson et al., 1986b, Hagen and Nelson, 1996, 1997) и морским штаммом 35Flor (Kamp et al., 2008; Brock et al., 2012; Schwedt et al., 2012), а также пресноводным штаммом *Beggiatoa leptomitoformis* D-402<sup>T</sup> (Grabovich et al., 2001). Эти штаммы способны к хемотаксису и ориентируются в градиенте кислород/сульфид, который они поддерживают путем быстрого окисления сульфида в микроаэробных условиях.

2. Большие, содержащие вакуоли, нитратзапасающие, автотрофные некультивируемые морские бактерии со статусом *Candidatus*, например "*Ca*. Maribeggiatoa", "*Ca*. Isobeggiatoa", "*Ca*. Parabeggiatoa". Клетки этих крупных, морских нитей *Beggiatoaceae* состоят из тонкого цилиндра цитоплазмы, окружающего большую центральную вакуоль. Наличие вакуоли обычно связано с высокой концентрацией внутриклеточного нитрата (Hinze, 1901, Jannasch et al., 1989; Nelson et al., 1989; Larkin and Henk, 1996, McHatton et al., 1996), за возможным исключением "*Ca*. Marithrix", в котором нитрат пока не был обнаружен в вакуолях (Kalanetra et al., 2004)

Все представители семейства *Beggiatoaceae*, способные к автотрофному росту, фиксируют CO<sub>2</sub> через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама. Активность
ключевого фермента цикла Кальвина-Бенсона-Бассама – РБФК была определена в нескольких штаммах *Beggiatoa*: MS-81-6, MS-81-1с, 35Flor, D-402, а также у "*Ca.* Maribeggiatoa", "*Ca.* Marithrix" (Hagen and Nelson, 1996; Патрицкая и др., 2001; Nelson et al., 1989; Kalanetra and Nelson, 2010). Скорость усвоения CO<sub>2</sub> значительно различается в пределах семейства: от 2,5 нмоль CO<sub>2</sub>/мин/мг белка для "*Ca.* Marithrix" (Kalanetra and Nelson, 2010) до 112-139 нмоль CO<sub>2</sub>/мин/мг белка для *Beggiatoa leptomitoformis* D-402 (Патрицкая и др., 2001), что сравнимо с активностью РБФК у типичных автотрофных организмов. Для "*Ca.* Maribeggiatoa" помимо активности РБФК еще одним подтверждением способности к автотрофному росту был опыт с <sup>14</sup>С изотопом (Larkin et al., 1994).

Для нескольких представителей семейства *Beggiatoaceae* автотрофный рост не был показан, но некоторые гены цикла Кальвина-Бенсона-Бассама были выявлены в геномах. Например, РБФК формы I была обнаружена в геномах "*Ca*. Isobeggiatoa" и "*Ca*. Marithrix" (Teske and Salman, 2014). В последнем геноме также было выявлено несколько копий гена, кодирующего белок Hat/HatR, поглощающего  $CO_2$  в карбоксисомах у цианобактерий (Salman-Carvalho et al., 2016).

*"Ca.* представителей Thiomargarita nelsonii" были Для вида отсеквенированы геномы двух штаммов: BudS10 и BOGUAY. В геноме BudS10 содержится ген РБФК второго типа (*cbbL*). В обоих отсеквеированных штаммах отсутствуют гены, кодирующие фруктозо-1,6-бисфосфатазу или седогептулозо-1,7-бисфосфатазу. MacGregor et al. (2013) постулировали, что функции этих ферментов может выполнять пирофосфат (PPi)-зависимая 6-фосфофруктокиназа (PfkA), как у некоторых гаммапротебактерий, являющихся эндосимбионтами (Kleiner et al., 2012; MacGregor et al., 2013a). В геномах штаммов BOGUAY и Bud S10 было выявлено два предполагаемых гена, кодирующих PfkA (Flood et al., 2016).

# 2.3. Метилотрофия у представителей семейства Beggiatoaceae

Среди представителей семейства *Beggiatoaceae* способность к метилотрофии была показана у двух штаммов *Beggiato alba*, B18LD и OH75-2a. Эти штаммы были способны использовать метанол в качестве единственного

источника углерода и энергии. Гены, кодирующие большую субъединицу метанол дегидрогеназы и четырех ферментов тетрагидрометанноптеринзависимого пути окисления C<sub>1</sub>-соединений были идентифицированы в B18LD. Никаких доказательств метанотрофии не было обнаружено (Jewell et al., 2008).

# 2.4. Литотрофный рост представителей семейств Beggiatoaceae на водороде

Крупные серные бактерии семейства *Beggiatoaceae* (Salman et al., 2011) обитают на границе аэробной и анаэробной зоны, где они часто накапливают большое количество биомассы и существенно влияют на местные циклы углерода, серы, азота и фосфора (Fossing et al., 1995; Schulz and Schulz, 2005; Prokopenko et al., 2013). Кроме того, было показано, что морской хемолитоавтотрофный штамм Beggiatoa 35Flor окисляет молекулярный водород с высокой скоростью (Kreutzmann and Schulz-Vogt, 2016). Известно также, что гетеротрофные пресноводные штаммы *Beggiatoa* окисляют водород при кратковременном попадании в анаэробные условия (Schmidt et al., 1987). Для показано. некоторых организмов было что экспрессия гидрогеназ, предназначенных катализирования окислительно-восстановительных для реакций с участием пары  $H^+$  /  $H_2$ , часто связана с фиксацией азота (Brito et al., 1997; Axelsson et al., 1999; Elsen et al., 2000; Happe et al., 2000). Многие представители семейства *Beggiatoaceae* способны к азотфиксации (Nelson et al., 1982), причем было показано, что водород выделяется при этом как побочный продукт (Burgess and Lowe, 1996). Однако отсутствие чистых культур препятствует физиологическим исследованиям метаболизма водорода в большинстве родов этого семейства. Напротив, большинство Beggiatoaceae являются удобными объектами для генетического анализа, независимого от наличия чистой культуры. Их большие и заметные клетки или нити легко могут быть разделены стерильным образом из образцов окружающей среды или накопительных культур и, таким образом, могут служить в качестве матриц для амплификации определенных генов или геномов (Mussmann et al., 2007; Salman et al., 2011, MacGregor et al., 2013).

В настоящее время признаны три филогенетически несвязанных класса гидрогеназ, которые отличаются аминокислотной последовательностью и ионом

металла в активном центре: [NiFe], [FeFe] и [Fe] (Wu and Mandrand, 1993; Vignais et al., 2001; Vignais and Billoud, 2007). Гидрогеназы класса [NiFe] считаются наиболее распространенными (Vignais and Billoud, 2007), и все гидрогеназы, идентифицированные у представителей *Beggiatoaceae*, относятся к этому типу (Kreutzmann, 2013).

Гены гидрогеназ были выявлены в геномах или амплифицированы при помощи специфических праймеров у *Beggiatoa* 35Flor, *B. alba* B18LD, *B.alba* B15LD, оранжевые нити из залива Гуаймас, "*Ca*. Allobeggiatoa salina" (Kreutzmann, 2013) и "*Ca*. Thiomargarita nelsonii" (Kreutzmann, 2013; Flood et al., 2016; Winkel et al., 2016). Литотрофный рост на водороде был подтвержден для *Beggiatoa* 35Flor при помощи микросенсорных измерений окисления водорода (Kreutzmann and Schulz-Vogt, 2016) и для "*Ca*. Thiomargarita nelsonii" путем измерения концентрации водорода с тетразолиевыми красителями (Bailey et al., 2017).

#### 2.5. Образование полисахаридных чехлов

В ходе нашего исследования мы обнаружили, что у одного из представителей семейства *Beggiatoaceae* вокруг нити может формироваться огромный слизистый чехол, предположительно состоящий из полисахаридов. Поэтому в данном обзоре было решено рассмотреть возможность образования полисахаридных чехлов у других бактерий.

Образование полисахаридных чехлов наблюдается у некоторых водных нитчатых бактерий, принадлежащих к филуму Proteobacteria (van Veen et al., 1978; Kanagawa et al., 2000; Howarth et al., 1999; Larkin and Shinabarger, 1983; Williams and Unz, 1985), Bacteroides (van Veen et al., 1973). Эти оболочки стимулируют прикрепление к твердым поверхностям, защищают клетки от засухи, инфицирования бактериофагами и простейшими хищниками. Оболочка образована локальной агрегацией полимеров, секретируемых клетками. Типичные бактериальные внеклеточные полимеры собираются не упорядоченным образом, а образуют либо случайную сетку, либо слизистый слой. Полимеры, образующие оболочку, ассоциируют автономно с образованием упорядоченных структур в форме микротрубочек.

Оболочки бактерий из филума Proteobacteria хорошо изучены (Romano and Peloquin, 1963; Emerson and Ghiorse, 1993; Takeda, 2010). В этом филуме были идентифицированы три рода, синтезирующих внеклеточные полисахаридные образования: роды Sphaerotilus и Leptothrix в классе бетапротеобактерии (van Veen et al., 1978) и род *Thiothrix* в классе гаммапротеобактерии (Williams and Unz, 1985). Для родов Sphaerotilus и Leptothrix формирование полисахаридных чехлов является типичным признаком (van Veen et al., 1978; Siering, 1996). Химическая структура синтезируемых ими экзополисахаридов может сильно различаться. Недавно было обнаружено, что оболочки Sphaerotilus-Leptothrix собираются из уникального полимерного гликоконъюгата, известного как тиопептидогликан (Kondo et al., 2011; Takeda et al., 2010). Тиопептидогликан является полимерным гликоконъюгатом, основной амфотерного состоящим цепи ИЗ гетерополисахарида и боковых цепей дипептида, состоящих из глицина и цистеина. Обилие тиоловых групп, вероятно, играет важную роль в поддержании структуры оболочки.

Виды *Thiothrix* можно разделить на две основные группы с точки зрения формирования оболочки. *T. nivea* (van Veen et al., 1973), *T. fructosivorans* (Hoiczyk, 1998), *T. caldifontis* (Zippel and Neu, 2011) и *T. lacustris* (Zippel and Neu, 2011) способны образовывать оболочку, тогда как все остальные виды не покрыты оболочкой. Среди образующих оболочку видов были исследованы только *T.nivea* (Takeda et al., 2010) и *T. fructosivorans* (Kondo et al., 2011). Обнаружено, что обе оболочки обычно собираются из (1,4)-связанных глюкозаминоглюканов, модифицированных дезоксисахарами (рис. 5).



Рис. 5. Химическая структура полисахаридов у *T. fructosivorans* 

Дезоксисахарные остатки, выступающие из глюкозаминоглюкана в положении 3 Glc, могут способствовать гидрофобным и водородным связям между полисахаридами (Takeda et al., 2012; Kondo et al., 2013; Kawasaki et al., 2016). Общие внеклеточные полисахариды, секретируемые бактериями, обычно ассоциируют с образованием слоя слизи, капсулы или гликокаликса в зависимости от физических свойств полисахаридов (Siering and Ghiorse, 1996).

#### Глава 3. Новые «бесцветные серобактерии»

В последнее десятилетие расширяется состав группы «бесцветные серобактерии». К этой группе стали относить представителей разных классов протеобактерий, которые раньше считали типичными гетеротрофами. Способность к литотрофному росту была показана в присутствии тиосульфата и сероводорода. При окислении сероводорода в клетках показано отложение элементной серы, что характерно для типичных бесцветных серобактерий.

До недавнего времени бактерии рода *Leucothrix* не относили к серобактериям. Дульцевой Н.М. и Дубининой Г.А. (Дульцева, 1996; Дульцева и др., 1996) из морских эпифитных обрастаний литорали Белого моря впервые были выделены новые серобактерии, способные внутриклеточно накапливать элементную серу в присутствии восстановленных соеднений серы и морфологически сходные с *Leucothrix: Leucothrix thiophila* (Дульцева и др., 1996). К сожалению, культуры были утеряны. У типового вида этого рода - *Leucothrix mucor* исследователи также ранее отмечали способность к спорадическому накоплению элементной серы внутриклеточно в присутствии восстановленных соединений серы и

Изучение углеродного и серного метаболизма *L. mucor* DSM 2157 показало, что этот штамм способен использовать соединения серы в энергетическом метаболизме, но только при низких концентрациях органических соединений (Grabovich et al., 1999). У *L. mucor* DSM 2157 при гетеротрофном росте была выявлена высокая активность ферментов ЦТК. Было показано, что лишь при низкой концентрации органических соединений, когда их количества недостаточно для конструктивного и энергетического метаболизма, восстановленные соединения серы включаются в энергетический метаболизм и бактерии переключаются на литогетеротрофный рост (Грабович и др., 1996).

Также типичными гетеротрофными организмами считались представители родов *Sphaerotilus* и *Azospirillum*. Однако около 10 лет назад в сероводородных источниках Северного Кавказа были обнаружены микробные сообщества сероокисляющих бактерий, включающих представителей данных родов (Гриднева и др., 2009; Черноусова и др., 2008; Lavrinenko et al., 2010). Для них

также был показан литотрофный рост в присутствии восстановленных соединений серы (Белоусова, 2011; Фролов и др., 2013).

полифазный Проведенный анализ, включающий исследование фенотипических, генотипических и филогенетических свойств позволил расширить границы в рамках вида *S. natans* - описано 2 подвида, *S. natans* subsp. natans и S. natans subsp. sulfidivorans. Выделение подвида Sphaerotilus natans subsp. sulfidivorans основано на способности штаммов данного подвида доминировать В биотопах, представленных природными сульфидными источниками, и использовать неорганические восстановленные соединения серы (сероводород, тиосульфат) в качестве энергетического субстрата. В природных условиях в протоке сероводородных вод клетки наполнены включениями элементной серы. Способность к литотрофии у Sphaerotilus natans subsp. sulfidivorans подтверждена на биохимическом и генетическом уровнях: процесс окисления тиосульфата до сульфатов сопряжен с функционированием электронтранспортной цепи; обнаружены гены ферментов серного метаболизма, такие как aprBA, soxB и sqr, кодирующие АФС-редуктазу, один из генов Soxкомплекса и сульфид-хинон оксидоредуктазу; показана экспрессия генов *аргВА* и soxB; обнаружена активность АФС-редуктазы и сульфитоксидоредуктазы. Способность к литотрофии индуцируется у большинства штаммов Sphaerotilus natans subsp. sulfidivorans в микроаэробных условиях.

В данном обзоре мы более подробно рассмотрим одного из представителей рода *Azospirillum*, который ранее не относили к бактериям, способным к диссимиляционному окислению восстановленных соединений серы – *A*. *thiophilum*.

Род *Azospirillum* является членом класса альфапротеобактерии. Представители рода *Azospirillum* относятся к ассоциированным азотфиксаторам.

Члены рода *Azospirillum* в основном распространены в почвах и часто ассоциированы с травами, зерновыми культурами (Döbereiner & Day 1976, Ladha et al., 1987; Lin et al., 2015; Kirchhof et al., 1997). *Azospirillum rugosum* (Young et al., 2008) и *Azospirillum picis* (Lin et al., 2009) были выделены из загрязненной нефтью почвы и придорожного мусора. *Azospirillum thiophilum* был выделен из

сульфидного источника (Lavrinenko et al., 2010). *Azospirillum humicireducens* (Zhou et al., 2013) был выделен из микробного топливного элемента.

В настоящее время виды, принадлежащие к роду *Azospirillum* с валидно опубликованными названиями, регистрируются на веб-сайте LPSN (номенклатурный список Euzeby, <u>http://www.bacterio.net/azospirillum.html</u>). На данный момент там насчитывается 17 видов.

#### 3.1. Серный метаболизм у Azospirillum

Для *A. thiophilum* BV-S<sup>T</sup>, выделенного из умеренно термального сульфидного источника (Lavrinenko et al., 2010), показана способность к литотрофному росту за счет окисления восстановленных соединений серы. фактором, определяющим тип энергетического метаболизма Основным (органотрофный или литотрофный) в присутствии тиосульфата, является концентрация кислорода в среде. В микроаэробных условиях при концентрации около 2 мг/л О<sub>2</sub> в жидкой среде А. thiophilum BV-S<sup>T</sup> осуществляет литогетеротрофный тип метаболизма, а окисление тиосульфата до тетратионата сульфата происходит с участием ферментов серного метаболизма И диссимиляционного типа. В клетках обнаружены две ферментные системы: тиосульфатдегидрогеназа, катализирующая неполное окисление тиосульфата до тетратионата, и тиосульфатокисляющий ферментный Sox-комплекс, с участием которого происходит полное окисление тиосульфата до сульфата. У А. thiophilum BV-S<sup>T</sup> выявлена генетическая детерминированнность компонента Soxкомплекса: обнаружен ген *soxB* и показано, что в микроаэробных условиях аэробными культивирования по сравнению с экспрессия гена *soxB* увеличивается в 32 раза (Фролов и др., 2013).

#### 3.2. Автотрофия у представителей рода Azospirillum

Большинство азоспирилл не способно к автотрофному росту. Для *A. lipoferum* была показана способность к автотрофному росту. Ассимиляция CO<sub>2</sub> осуществляется через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама, однако наличие генов этого цикла не было продемонстрировано при анализе генома у *A. lipoferum* (Baldani et al., 2014; Sant'Anna et al., 2011), а в базе данных ГенБанк имеются лишь гены большой и малой субъединиц РБФК и их фрагменты. В геноме *A.*  *amazonense* Y2, впоследствии реклассифицированной как *Nitrospirillum amazonense* (Lin et al. 2014), было показано наличие кластера генов цикла Кальвина-Бенсона-Бассама. Основными генами этого кластера являются гены *cbbL* и *cbbS*, и они кодируют соответственно большие и малые субъединицы РБФК (Sant'Anna et al., 2011; Cecagno et al., 2015).

#### 3.3. Метилотрофия у представителей рода Azospirillum

Три штамма Azospirillum, B2, B21 и B22 были выделены из накопительных метанокисляющих культур, полученных из сфагнового болота, поэтому для них была предположена способность к росту на C<sub>1</sub>-соединениях (Дорошенко и др., 2007). Для штамма B2 недавно был получен драфт-геном (Grouzdev et al., 2018), который сможет пролить свет на метаболический потенциал данных бактерий, а именно способность к метилотрофному росту, однако авторы пока не проводили анализ генома, и не выявляли гены, кодирующие ферменты, участвующие при метано- или метилотрофном росте. Больше ни для одного представителя рода *Azospirillum* даже не высказывалось предположение о способности к метано- или метилотрофному росту. Гены, кодирующие ферменты окисления метанола, были обнаружены в геномах двух видов *Azospirillum - A. lipoferum* и *A. humicireducens*, но на данный момент нет экспериментальных данных, устанавливающих их способность к окислению метанола.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ

Для большинства бесцветных сероокисляющих бактерий доступна информация только о морфологии и сиквенсах отдельных генов. Многие полученные ранее чистые культуры серобактерий были утрачены, для других организмов получить чистые культуры никогда не удавалось. В международных базах данных высококачественных очень мало полногеномных последовательностей ДЛЯ представителей данной группы. В основном представлены драфт-геномы или последовательности отдельных генов. По этим причинам на сегодняшний день серобактерии остаются слабоизученными.

Характерным признаком бесцветных сероокисляющих бактерий является способность к литотрофному рост в присутствии восстановленных соединений серы, а также внутриклеточное запасание серных глобул в присутствии сульфида или тиосульфата. С увеличением наших знаний о биоразнообразии и метаболизме состав данной группы меняется. В нее включаются некоторые организмы, ранее считавшиеся типичными гетеротрофами, поскольку для них обнаруживается способность к литотрофному росту на восстановленных соединениях серы. С другой стороны, некоторых бактерий, которых ранее относили к бесцветным сероокисляющим, исключают из данной группы, поскольку для них показано, что окисление серных соединений не сопряжено с функционированием ЭТЦ и осуществляется по перекисному механизму.

Систематика бесцветных серобактерий до конца не завершена и продолжает развиваться. Традиционно серобактерий, относящихся к классу гаммапротеобактерии, классифицировали в три семейства: *Beggiatoaceae*, *Leucotrichaceae* и *Achromatiaceae*. Однако в 2005 году было предложено объединить все три семейства в единое семейство *Thiotrichaceae*. Данное предложение неоднократно подвергалось критике, поскольку противоречило правилу 51b Бактериологического кодекса: в 2011, 2013 году было предложено вернуть семейство *Beggiatoaceae* и *Achromatiaceae*, а в 2018 – выделить также семейства *Leucotrichaceae*, *Thiolinaceae* fam. nov., *Thiofilaceae* fam. nov. и

*Thiotrichaceae*, в которое входит род *Thiothrix*. Состав семейства *Thiotrichaceae* до сих пор дискутируется.

В обзоре подробно рассмотрен метаболизм представителей семейства *Beggiatoaceae*. Это авто-, гетеро- или миксотрофные организмы, способные как к хемоорганотрофии, так и к хемолитотрофии в присутствии восстановленных соединениях серы или молекулярного водорода. Конечным акцептором электронов выступает кислород и иногда нитраты. Некоторые представители семейства способны к метилотрофному росту.

При литотрофном росте представителей семейства Beggiatoaceae в присутствии тиосульфата последний может окисляться по разветвленному Soxпути с образованием сульфатов и внутриклеточным накоплением элементной серы. Для нескольких представителей семейства было показано наличие системы rDSR, которая может окислять внутриклеточные серные глобулы до сульфита. Ни у одного представителя семейства не было показано наличие генов soxCD, которые принимают участие в прямом пути окисления тиосульфата до представителей семейства было сульфата. Для некоторых высказано предположение о способности окислять тиосульфат по пути с интермедиатом тетратионатом при помощи тиосульфатдегидрогензы, однако ни в одном случае данное предположение не было доказано.

Представители семейства *Beggiatoaceae* способны к литотрофному росту на сульфиде, окисляя его до серы при помощи сульфид:хинон оксидоредуктазы типа I (SqrA) или типа II (SqrF), либо при помощи флавоцитохром с сульфиддегидрогеназы (FccB).

При автотрофном росте все представители семейства фиксируют CO<sub>2</sub> через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама, а при росте на молекулярном водороде используют [NiFe]-гидрогеназы.

Однако многие вопросы, связанные с таксономией и метаболизмом группы сероокисляющих бактерий, пока остаются не решенными.

47

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### Глава 4. Объекты и методы исследования

#### 4.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования были использованы штаммы бесцветных серобактерий, приведенные в талице 2.

Вид	Штамм	№ в международных коллекциях
		микроорганизмов
Thioflexithrix psekupsensis	D3 <sup>T</sup>	KCTC 62399, UNIQEM U981
Beggiatoa leptomitoformis	D-402 <sup>T</sup>	DSM-14946, UNIQEM U 779
Beggiatoa alba	B18LD	ATCC 33555
Beggiatoa alba	B15LD	DSM-1416
Azospirillum thiophilum	BV-S <sup>T</sup>	DSM-21654, VKM B-2513

Таблица 2. Штаммы бактерий, используемые в работе.

#### 4.2. Методы исследования

#### 4.2.1. Состав питательных сред

Для культивирования штамма D3 использовали среду следующего состава ( $\Gamma \cdot \pi^{-1}$  дистиллированной воды): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0.15, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0.075, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O – 0.05, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0.1, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O – 1.5, NaHCO<sub>3</sub> – 0.5; aгар – 0.5. В среду перед посевом вносили набор витаминов и микроэлементов (Pfennig and Lippert, 1966; Kuznetsov and Dubinina, 1989). pH среды перед посевом доводили до значения 7,2 – 7,5. Для культивирования использовали метод создания градиентных сред. В качестве нижнего слоя использовали столбик агара в концентрации 15 г/л, содержащий Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O (600 мг/л); в качестве верхнего слоя среду вышеописанного состава. Высота нижнего слоя составляла 3-4 см, а высота верхнего слоя - 4-5 см. Инкубировали при температуре 29 °C. Интервал между пересевами составлял 3-4 суток.

Для культивирования штамма BV-S использовали жидкую PSS среду следующего состава ( $\Gamma \cdot \pi^{-1}$  дистиллированной воды): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 1,0; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O - 0,03; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 1,0; Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>· 5H<sub>2</sub>O - 1; сукцинат натрия - 1,0; пептон - 2,0; набор витаминов и микроэлементов (Pfennig and Lippert, 1966; Kuznetsov and Dubinina, 1989). Для автотрофного культивирования в микроаэробных условиях

использовали среду вышеуказанного состава без сукцината натрия и пептона, внося в качестве единственного источника углерода NaHCO<sub>3</sub> (0,5 г·л<sup>-1</sup>) и в качестве донора электронов – тиосульфат (1 г·л<sup>-1</sup>) либо H<sub>2</sub> (50% от газовой фазы).

Для культивирования штаммов рода *Beggiatoa* использовали жидкую среду следующего состава (г ·  $\pi^{-1}$  дистиллированной воды): NaNO<sub>3</sub> – 0,62; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,125; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O – 0,03; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,5; KCl – 0,125; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0,05. Перед инокуляцией в 1 л среды добавляли в качестве стерильных растворов микроэлементы и витамины (Pfennig and Lippert, 1966; Kuznetsov and Dubinina, 1989) – 1 мл; pH среды доводили до значения 7,2 -7,5.

При культивировании в литогетеротрофных условиях после автоклавирования вносили следующие соединения (г/л): NaHCO<sub>3</sub> – 0,125; Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O – 1,0; лактат натрия – 0,5; пептон – 0,5. При метилотрофном культивировании штамма D-402 после автоклавирования вносили CH<sub>3</sub>OH – 0,3 г/л, pH среды доводили раствором NaOH, 1%.

#### 4.2.2. Микроаэробное культивирование

Бактерии культивировали во флаконах емкостью 0,5 л с прокладками из полибутиловой резины и завинчивающимися металлическими колпачками в 100 мл жидкой среды. Создавали газовую фазу с различным содержанием кислорода. С этой целью бутыли сначала заполняли доверху свежепрокипяченой стерильной средой и затем вытесняли определенный объем жидкости аргоном и, дополнительно, необходимым объемом воздуха в определенных соотношениях. Стерилизация газовой фазы достигалась путем пропускания через бактериальные ультрафильтры диаметром 0,2 мкм (Millipore, США). После этого вносили культуру. Соотношение объемов жидкой и газовой фаз составляло 1:4 для предотвращения заметного снижения О<sub>2</sub> в газовой и жидкой фазе по мере его потребления бактериями (табл. 3).

Таблица 3.	Содержание	кислорода	в газовой	и жидкой	фазах і	в зависим	юсти от
	КОН	центрации	воздуха в	газовой d	разе		

Содержание воздуха в газовой фазе, %	7,1	3,55	1,75
Содержание кислорода в газовой фазе, %	1,5	0,7	0,35
Концентрация растворенного О2 в среде, %	2,1	1,0	0,48

# 4.2.3. Методы изучения морфологии, ультрастуктуры и внутриклеточных включений

Морфологию клеток исследовали в микроскопе CX-41 фирмы «Olympus» с фазово-контрастным устройством. Размеры клеток измеряли в фазе логарифмического роста после 24 часовой экспозиции на стандартной среде с помощью окулярмикрометра. Препараты для микроскопирования готовили общепринятыми методами. Элементную серу и липиды внутри клеток идентифицировали по характерному светопреломлению в проходящем поляризованном свете.

Препарирование клеток (фиксацию, обезвоживание и заключение в эпоксидную смолу) осуществляли по методу Strohl and Larkin, 1978. Ультратонкие срезы монтировали на опорные сеточки, контрастировали в течение 30 мин в 3% растворе уранилацетата в 70% спирте и дополнительно контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу (Reynolds, 1963). Ультратонкие срезы просматривали в электронном микроскопе JEM-1200 EX (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кв.

#### 4.2.4. Получение клеточной суспензии и ферментных экстрактов

Суспензию клеток получали путем центрифугирования культур микроорганизмов при 8000 g, в течение 10 минут. Клетки отмывали 0,05 мМ трис-HCl-буфером (pH = 7,5). Центрифугирование проводили на центриуге MiniSpin (Eppendorf, CША).

Клеточные экстракты (гомогенат) получали в результате разрушения бактериальных клеток с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т (Укрросприбор, Украина) при мощности 500 Вт и частоте 22 кГц 3 раза по 30 сек на ледяной бане. Супернатант (цитоплазматическую фракцию) получали после

центрифугирования гомогената при 8000 об/мин с охлаждением в течение 10 минут.

#### 4.2.5. Методы определения активности ферментов

Определение ферментативной активности проводили в супернатанте клеточного экстракта из двухсуточной культуры в середине фазы экспоненциального роста (Грабович, 1984). Удельную активность ферментов (Е·мг белка<sup>-1</sup>) выражали в мкмоль·мин<sup>-1</sup>·мг белка<sup>-1</sup>.

Метод определения активности *РБФК* (КФ 4.1.1.39) основан на прямом спектрофотометрическом измерении скорости исчезновения рибулозо-1,5бисфосфата. Измерения проводили при 280 нм (Романова, 1980) на спетрофотометре СФ-56 (ОКБ Спектр, Россия).

Активность *фосфорибулокиназы* (КФ 2.7.1.19) определяли по скорости накопления щелочногидролизуемого фосфора рибулозо-1,5-дифосфата (Романова, 1980).

Активность *карбоангидразы* (КФ 4.2.1.1) была определена путем измерения времени перехода цвета индикатора (бромтимоловый) от синего к жёлтому (Wilbur and Anderson 1948). Активность фермента рассчитывали в условных единицах (у.е.) Вильбура и Андерсена<sup>.</sup> мин<sup>-1</sup>·мг белка<sup>-1</sup>.

Активность фосфоглюкомутазы (КФ 2.7.5.1) определяли спектрофотометрически при  $\lambda = 750$  нм по скорости уменьшения количества легкогидролизуемого фосфора (Романова, 1980).

Активность *метанолдегидрогеназы* (КФ 1.1.2.7) определяли по модифицированному методу Anthony C. и Zatman J. (Anthony & Zatman, 1967; Kalyuzhnaya et al., 2008).

Активность формиатдегидрогеназы (КФ 1.2.1.2) фиксировали по увеличению оптической плотности раствора за счет накопления NADH при  $\lambda$  = 340 нм. Измерения проводились в фосфатном буфере pH 7,0, который содержал: 1,6 мМ NAD; 0,3М формиата натрия. Реацию инициировали добавлением ферментативной вытяжки (Egorov et al., 1979).

Метод определения активности *цитохром с*551 пероксидазы (КФ 1.11.1.5) основан на спектрофотометрическом измерении скорости окисления

ферроцитохрома в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и пероксидазы. Измерения проводили при 515 нм (Foote et al., 1983).

Определение активности *супероксиддисмутазы* (1.15.1.1) осуществляли согласно методу Winterbourn. Этот метод основан на способности фермента ингибировать восстановление реактива Nitro Blue Tetrazolium (NBT). Измерения проводились при  $\lambda = 540$  нм (Winterbourn et al., 1985).

Активность *тиосульфатдегидрогеназы* (КФ 1.8.2.2) и *тиосульфогидролазы SoxB* определяли спектрофотометрически в супернатанте по скорости восстановления K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] ( $\lambda$ =420 нм) или цитохрома *c* ( $\lambda$  = 550 нм) в присутствии окисляемого субстрата – тиосульфата натрия (5 г/л) в 0,1 М трис-HCl, pH=4.5 и в 0,1 М трис-HCl pH=7.5, соответственно.

Активность *родоназы* (КФ 2.8.1.1) определяли по видоизмененной методике Sorbo (Sorbo, 1955) по образованию тиоционата, который определяли колориметрическим методом. Активность фермента учитывали в супернатанте по скорости образования тиоционата колориметрическим методом на спектрофотометре СФ-26 при  $\lambda$ =460 нм.

Активность *гидрогеназы* (КФ 1.12.1.2) определяли при  $\lambda = 600$  нм. Среда фотометрирования (ммоль/л): трис-HCl-буфер – 100 (рН 9.2); метилвиолаген – 20,0; ДТТ – 0,5. Предварительно 0,2 мл культуры и 1,0 мл среды фотометрирования инкубировали 10 минут в атмосфере водорода при 27°С. Затем добавляли дитионит для восстановления метилвиолагена. Об активности судили по падению оптической плотности восстановленного метилвиолагена (Children and Kenneth 1984).

Изучение активности *сукцинатдегидрогеназы* (КФ 1.3.99.1) проводили феназинметасульфатным методом при  $\lambda = 600$  нм (Veeger 1969). Определение проводили в гомогенате.

Активность дегидрогеназ определяли в супернатанте при  $\lambda = 340$  нм по скорости окисления (восстановления) соответствующих коферментов: НАДН или NADPH (*малатдегидрогеназы* (КФ 1.1.1.37; 1.1.1.82), и изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.42) (Романова, 1980), в соответствующих реакционных средах.

Активность гидратаз определяли методом, основанном на учете разности поглощения лучей при  $\lambda = 240$  нм цитратом по сравнению с цис-аконитатом (Rice and Pon, 1975) и малатом по сравнению с фумаратом (Reyns and Leonis, 1974), для *аконитатидратазы* (КФ 4.2.1.3) и *фумаратидратазы* (КФ 4.2.1.2) соответственно.

Активность *изоцитратлиазы* (КФ 4.1.3.1) определяли по разнице поглощения при при  $\lambda = 324$  нм комплекса, образующегося в результате взаимодействия фенилгидразина, присутствующего в реакционной среде, и глиоксилата, возникающего в ходе ферментативной реакции (Землянухин и др., 1986).

Цитратсинтазу (КФ 4.1.3.7) и малатсинтазу (КФ 4.1.3.2) определяли при  $\lambda = 412$  нм. Метод основан на спектрофотометрическом измерении скорости появления тиоловых групп свободного СоА, регистрируемого с помощью реактива Эллмана. Образующийся меркаптид-ион имеет максимум поглощения при  $\lambda = 412$  нм (Резников и др., 1970).

Содержание белка определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

Опыты проводили в 3-4 кратных повторностях, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. При статистической обработке данных использовался непараметрический t-критерий Стьюдента. Обсуждаются статистически достоверные различия при р < 0.05 (Лакин, 1990).

В таблицах цифры представляют средние величины из трех определений; разброс данных не превышал 10 – 15 %.

#### 4.2.6. Физико-химические методы анализа

#### 4.2.6.1. Определение хинонов

Дыхательные хиноны анализировали с помощью системы HPLC Agilent 1260 (США) (колонка C18, одновременное ELSD (датчик испарительного светорассеяния) и УФ-детектирование) со стандартными образцами хинонов (Sigma-Aldrich) и хинонов из эталонных штаммов (*E. coli*), используемых для калибровки колонки.

#### 4.2.6.2. Анализ жирнокислотного состава

Профили жирных кислот клеток определяли с использованием версии 6.1 для программного обеспечения Microbial Identification System (MIDI) Sherlock (метод и таблица пикового наименования: ANAER6), как описано Sasser et al. (1990).

# 4.2.6.3. Методы определения продуктов превращения соединений серы

Раздельное определение  $S_2O_3^{2-}$ ,  $S_4O_6^{2-}$ ,  $S_3O_6^{2-}$  при их совместном присутствии в среде проводили методом раздельного иодометрического титрования (Резников и др., 1970).  $SO_4^{2-}$  определяли хлоранилатным методом. Элементную серу определяли по методу Морриса (Morris et al., 1948). Элементную серу внутри клеток идентифицировали по характерному светопреломлению проходящем поляризованном свете.

# 4.2.7. Методы молекулярной биологии и биоинформатики

#### 4.2.7.1. Выделение ДНК, секвенирование и аннотирование геномов

Геномная ДНК была выделена из культуры BV-S<sup>T</sup> с использованием стандартного протокола фенол-хлороформной экстракции, из культуры D-402<sup>T</sup> – по методу Мармура (Marmur, 1961), а из культуры D3<sup>T</sup> с использованием коммерческого набора QIAGEN (США) с модификациями. Качество проб оценивалось путем электрофореза в 1% агарозном геле в ТВЕ буфере, концентрация ДНК определялась при помощи спектрофотометра ND-1000 (NanoDrop Technologies, США). Геномы секвенировали с использованием Pacific Biosciences платформы секвенирования RSII. Дополнительные генетические предсказания и функциональный анализ были выполнены с использование серверов RAST (Aziz et al., 2008) и KAAS (Moriya et al., 2007) с параметрами по умолчанию. Дополнительная аннотация некоторых генов проводилась вручную, при помощи BLAST (Altschul et al., 1990) с использованием неизбыточной белковой базы данных. Попарное выравнивание последовательностей проводили с помощью алгоритма выравнивания Нидлмана–Вунша (Needleman–Wunsch) (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss

<u>needle/</u>). Круговые карты хромосом были сделаны с помощью DNAPlotter (Carver et al., 2009)

# 4.2.7.2. Построение филогенетических деревьев и статистическая оценка результатов кластеризации

Для построения филогенетических деревьев использовали последовательности, доступные в публичных базах данных банка генов национального центра биологической информации (NCBI - http://www.ncbi.nlm.nih.gov) и полученные нами последовательности.

Последовательности были выровнены с использованием MUSCLE (<u>https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/</u>). Выбор наилучшей модели замен осуществлялся в программе MEGA X (Kumar et al., 2018). Филогенетические деревья были реконструированы с использованием методов Neighbour-Joining и Maximum-Likelihood (Felsenstein, 1985; Saitou and Nei, 1987). Статистическая оценка результатов кластеризации проводилась с помощью "bootstrap" – анализа 1000 альтернативных деревьев.

#### 4.2.7.3. Определение уровня экспрессии генов

РНК выделяли с помощью pearenta ExtractRNA (Evrogen, Россия) по протоколу производителя. Качество РНК оценивали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с 2,2М формальдегида. Концентрацию РНК измеряли с Qubit R RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) на флюориметре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, USA). 1000 нг РНК затем были обратно транскрибированы на приборе Eppendorf Mastercycler Personal с использованием M-MulV (SybEnzyme, Russia) согласно протоколу производителя. Количественную ПЦР проводили с использованием SYBR Green I на Bio-Rad CFX96TM Real-Time System (Bio-Rad, USA). Чтобы найти оптимальную для амплификации был температуру, применен температурный градиент. Полученная программа включала начальную денатурацию при 95° С в течение 3 мин; а затем 39 циклов денатурации 20 с при 95 ° С, 20-секундный отжиг праймера при 57° - 60° С и 30 секунд элонгации при 72° С. Праймеры, используемые работе, подбирали в **PrimerBLAST** В

# (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</u>). Их последовательности,

температура отжига и длины продуктов приведены в таблице 4.

Штамм	Ген	Праймер	Последовательность	Темпера- тура отжига, <sup>0</sup> С	Длина продукта, п.о.
	xoxF	Прямой	AACTTCGCCCTGTTTGGACA	60	339
		Обратныи			
	mdh2	Прямои	ATTCCCACCGTTTACCCGAC	59	334
		Обратныи	CCTTCAACGAGAGGACGCAT		
	frk	Прямой	GCCCCCTACAATCAAGACCC	60	258
	<i>J</i>	Обратный	TAATCTGGCATACGGCGCAA		
$D-402^{T}$	rhcL	Прямой	CGTTGTAGAACGGGAACGAT	59	208
D 102	TOCL	Обратный	GGCTTCCATCGCAAATAAAA		200
	sorB	Прямой	CCCTCACGCTTTATTCCCGA	57	187
	SUAD	Обратный	GCGTATGTCCGCCAAGGATA	51	
	165	Прямой	TGGTAGTCCACGCCCTAAAC	50	261
	105	Обратный	CCATGCAGCACCTGTCTCTA	59	
gyrB	D	Прямой	TGTGTCTGTGGTCAATGCGT	50	282
	gyrb	Обратный	ATCTTCGCGTCCTGTGGTTT	58	
rbcL mxaF prkB	1 7	Прямой	AACCCAAGGACACCGACATC	50	352
	rbcL	Обратный	GGTCTTCAGATAGGCGACCG	58	
		Прямой	GACCATGACCATTTTCGCCC	50	101
	mxaF	Обратный	TATAGACGATGCCGTTGCGG	59	181
	1.0	Прямой	GACCTGCTGTTCTACGAGGG	50	222
	Обратный	CTGAACTGCGGGCAGATGTA	59	223	
BA-2,		Прямой	AAGGGCTTCTACCAGCACAC	50	383
mdl	mdh2	Обратный	GCTGTAGGACATCGGGTTCC	59	
		Прямой	GCCGTCATAGTCCCATTCGT		
xo	xoxF	Обратный	ATCAACACCGGCAAGATGGT	59	377
		Прямой	CGAGTTCAATGCCGACAAGA		200
8	gyrB	Обратный	TTCAGATACCGTTCCCTGGC	58	
D3 <sup>T</sup> . D-		Прямой	TGACGTGTTAGGTGACGTGG		20.6
$402^{\mathrm{T}}$	nifH	Обратный	TCTTCACGGTCGGTGTTACG	59	206
T		Прямой	GACGATCCGTAGCTGGTCTG	- 59	
$D3^{T}$	16S	Обратный	TTAGCCGGTGCTTCTTCTGG		232

Таблица 4. Праймеры к генам, используемые в работе

# 4.2.8. Определение общего содержания углеводов

Для определения концентрации полисахаридов бактерии культивировали в микроаэробных условиях. Углеводы определяли фенольным методов на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 488 нм (Герхард, 1984).

#### 4.2.9. Выделение экзополисахаридов

Биомассу T. psekupsensis ресуспензировали в десятикратном объеме фосфатно-солевого буфера (pH 6,8), следующего состава ( $\Gamma/\pi$ ): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 3,39; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 3,53; NaCl – 8,0. Суспензию клеток перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 мин, клетки осаждали центрифугированием при 3000×g 30 Надосадочную жидкость отбирали, осадок клеток МИН. a вновь ресуспендировали в свежей порции буфера и процедуру повторяли. Объединенные фракции супернатантов концентрировали при 40°С на роторном вакуумном испарителе Laborota 4000 (Heidolph, Германия) до объема 5 мл, диализовали против дистиллированной воды 48 ч, вновь концентрировали и лиофилизировали Benchtop 2K (Virtis, США).

#### 4.2.10. Определение моносахаридного состава полисахаридов

Подготовку образцов для ГЖХ осуществляли по методу Sawardecker et al., 1965. ПС (0,3 мг) растворяли в 2 М трифторуксусной кислоте (0,3 мл) и гидролизовали в герметически закрытом контейнере 2 ч при 120 °C, затем кислоту упаривали досуха в токе воздуха. Гидролизат ПС восстанавливали свежеприготовленным раствором (0,3 мл) боргидрида натрия в гидроксиде аммония (10 мг NaBH<sub>4</sub> в 1 мл 1 М NH<sub>4</sub>OH) в течение 2 ч при комнатной температуре. Избыток боргидрида нейтрализовали концентрированной уксусной кислотой (30 мкл), растворитель удаляли упариванием досуха в токе воздуха. Подобную процедуру проводили один раз с 10 %-ным раствором уксусной кислоты в метаноле и трижды с метанолом. Ацетилирование проводили смесью пиридина и уксусного ангидрида (1:1) 0,6 мл в герметически закрытом контейнере 1 ч при 100 °C, ацетилирующую смесь упаривали досуха в токе воздуха, полученные ацетилированные производные полиолов растворяли в 50 мкл этилацетата.

Моносахариды идентифицировали методами ГЖХ на хроматографе на хроматографе GC-2010 (Shimadzu, Япония), снабженным капиллярной колонкой DB-5 (Hewlett-Packard, США), в градиенте температур от 160°С (1 мин) до 290°С со скоростью нагрева 7°С/мин. Относительное содержание сахаров было

представлено как соотношение площадей пиков по показаниям детектора прибора.

# 4.2.11. Получение ЯМР-спектра

Спектры ЯМР <sup>1</sup>Н зарегистрированы на приборе Bruker Advance DPX300 (Германия) в D<sub>2</sub>O при 30 °C. В качестве стандарта использованы сигналы остаточных протонов растворителя в спектрах ЯМР <sup>1</sup>Н.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Глава 5. Нитчатые представители семейства Beggiatoaceae

Семейство Beggiatoaceae включает крупные бесцветные сероокисляющие бактерии. Согласно последней филогенетической ревизии (Salman et al., 2011), в него входят три валидно описанных рода: Beggiatoa, Thioploca и Thiomargarita и девять родов со статусом Candidatus: «Candidatus Maribeggiatoa», «Candidatus *«Candidatus* Parabeggiatoa», *«Candidatus* Halobeggiatoa». Isobeggiatoa», «Candidatus Allobeggiatoa» «Candidatus Marithioploca», «Candidatus Thiopilula», «Candidatus Thiophysa» и «Candidatus Marithrix». Однако ни для одного таксона со статусом Candidatus, а также для родов Thioploca и Thiomargarita не удалось получить чистую культуру, что существенно ограничивает возможность исследования их метаболизма. Все сведения о них были получены главным образом на основании морфологии и драфт-геномов. В состав рода Beggiatoa входят два культивируемых пресноводных вида: *B. alba* и *Beggiatoa* sp. D-402. На момент наших исследований только для *B. alba* B18LD была получена геномная последовательность (NZ\_AHMA0000000.1). Также в ГенБанке содержится около 20 последовательностей 16S рРНК с родовым названием Beggiatoa (Salman et al., 2011; Ahmad et al., 2006; De Albuquerque et al., 2010; Hinck et al., 2007; Teske et al., 1995). Последовательности генов 16S рРНК были получены как для морских, так и для пресноводных бактерий.

#### 5.1. Штамм D3

В данном разделе описывается выделение и характеристика штамма D3 пресноводных нитчатых сероокисляющих бактерий, относящегося к новому роду в составе семейства *Beggiatoaceae*.

#### 5.1.1. Выделение штамма D3

Штамм D3 был выделен из образца, собранного из серного мата в микроаэробной зоне термального сульфидного источника в городе Горячий Ключ, Краснодарский край, Россия (N44 ° 38 'E39 ° 08') в августе 2012 года (рис. 6). Температура воды в месте отбора проб составляла 35 °C при температуре воздуха +32 °C, pH 7,5-8,0, суммарная минерализация 1,56-1,66 г/л, количество

кислорода 0,5-1 мг/л, количество сульфида 4,3 мг/л. Поступление кислорода в воду источника происходило при контакте с воздушной средой.



Рис. 6. Сульфидный источник в городе Горячий Ключ Краснодарского края, из которого был выделен *T. psekupsensis* D3. Масштаб, 10 см.

При выделении чистой культуры использовали способность нитей к скольжению по твердому субстрату. Образец помещали в чашки Петри с небольшим количеством воды из источника. Через 30-60 минут нити из-за их чувствительности к повышенной аэрации концентрировались в небольших комочках. Нити отбирали под бинокулярной лупой пипеткой с тонко оттянутом концом и переносили в небольшой объем природной стерильной воды, вылитой в чашку Петри. Процедуру отмывки нитей от контаминантов проводили 3-4 раза. Отмытые нити помещали на поверхность твердого агара в чашки Петри, предварительно подсушенного в течение 4-6 ч в термостате при температуре 60 ° С для удаления конденсата. Через регулярные промежутки времени от 4 до 6 часов и через день нити, которые отползли с участков посева, осторожно переносили в небольшой объем жидкой среды. Культуры инкубировали при температуре 32 ° С в течение 72-96 часов. Эти методы позволили избавиться от многочисленных сопутствующих бактериальных клеток, связанных со слизью, секретируемой данным микроорганизмом в больших количествах.

Эту бактерию культивировали в пробирках под ватными пробками на градиентной среде вышеуказанного состава. Интервал между пассажами составлял 5-7 дней.

#### 5.1.2. Морфология клеток

Бесцветные цилиндрические клетки штамма D3 объединены в нити длиной до 200 мкм. Диаметр клеток в нитях составляет 2,4-2,7 мкм, а длина клетки - 3,4-3,9 мкм. Нити распространяются при помощи гормогоний. Нити и гормогонии способны к скольжению. Внутри клеток запасаются глобулы элементной серы (рис. 7 А), которые откладываются в инвагинатах ЦПМ (рис. 7.Б). Также клетки часто содержат внутриклеточные гранулы полифосфата и поли-βгидроксиалканоата. Клетки имеют типичную грамотрицательную клеточную стенку.



Рис. 7. А - Микрофотография *Т. psekupsensis* D3. Масштаб, 10 мкм. Б – Ультратонкий срез. Масштаб, 0.2 мкм. СМ – цитоплазматическая мембрана, S – серные глобулы.

## 5.1.3. Физиологические характеристики

Облигатный хемолитоавтотроф. Донорами электронов могут быть тиосульфат, сульфид и H<sub>2</sub>. Штамм D3 является микроаэрофильным факультативным анаэробом. Он образует мощные слизистые образования, которые снижают скорость диффузии кислорода в клетки во время культивирования (рис. 8). Он способен к анаэробному дыханию на ДМСО и фумарате.



Рис. 8. А - слизистые образования при культивировании *T. psekupsensis* D3. Масштаб, 1 см. Б – электронная микрофотография *T. psekupsensis* D3. Масштаб 0.2 мкм.

В качестве источника азота могут использовать аммоний, нитрат, нитрит, пептон, гидролизат казеина, аспартат и дрожжевой экстракт. Организм способен к фиксации молекулярного азота. Все гены нитрогеназного комплекса (*nifENXAHDKTSUVWZBOQ*) присутствуют в геноме штамма D3 (табл. П1, рис. 10). Экспрессия маркерного гена нитрогеназы (*nifH*) на среде без источников азота оказалась примерно в 150 раз выше, чем на азотсодержащей среде (рис. 9).



Рис. 9. Уровень экспресии гена *nifH* у *T. psekupsensis* D3 при культивировании на полной среде (N+) и на среде без источников азота (N-). \* p < 0.05.

Штамм D3 не способен гидролизовать крахмал. Каталазаотрицательный. Оксидазаположительный. Температурный интервал для роста находится между 10 и 43 ° C, с оптимумом при 32 ° C. Диапазон pH для роста составляет 6,8-7,6, при оптимальном pH 7,2. Не растет при концентрации NaCl выше 2%. Организм устойчив к рифампицину (100 мг/л).

Дифференциальные характеристики штамма D3 и доступных на сегодняшний день в чистых культурах типовых штаммов пресноводных *Beggiatoa* перечислены в таблице 5.

# пресноводных Beggiatoa

1, *Thioflexithrix psekupsensis* D3<sup>T</sup>; 2, *Beggiatoa leptomitoformis* D-402<sup>T</sup>; 3, *Beggiatoa alba* ATCC 33555<sup>T</sup>. Все данные были исследованы авторами в тех же лабораторных условиях, некоторые из них были опубликованы ранее: 2 (Dubinina et al., 2017), 3 (Mezzino et al., 1984; Kobayashi & Shibata, 1999). Н.о. – не определяли.

Штамм D3<sup>T</sup> не может использовать ни один из проверенных органические субстратов для органотрофного роста. В качестве источников азота может использовать аммоний, нитрат, нитрит, пептон, гидролизат казеина и аспартат.

Все три штамма способны к фиксации молекулярного азота, каталазаотрицательны, оксидазаположительны, способны использовать сульфид и тиосульфат в качестве доноров электронов и не могут использовать глицерин в качестве источника углерода.

Характеристики	1	2	3	
Лиаметр клетки / длина	2.4-2.7/3.4-3.9	1.5-2.5 (3.0)	3.0-3.5 (5.0)	
клетки (максимальное				
значение), мкм				
Длина нитей (мкм)	200	50-200	60–120	
Пределы (и оптимум)	10-46 (32)	8-35 (28)	0–38	
температуры, °С				
Пределы (и оптимум) рН	6.8 - 7.6 (7.2)	6.0-8.2 (7.5-7.8)	7.0–7.3 (7.2–7.3)	
Максимальная	2 %	0.3 %	1 %	
концентрация NaCl для				
роста				
Г+Ц состав ДНК (мол. %)	42.1	42.1	41.1	
Восстановление S <sup>o</sup> или	-	+	+	
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> до H <sub>2</sub> S				
Используемые акцепторы				
электронов:				
Фумарат	+	-	-	
ДМСО	+	-	-	
O <sub>2</sub>	+*	+	+	
Гидролиз крахмала	-	+	-	
Используемые доноры				
электронов:				
H <sub>2</sub>	+	+	-	
$CS_2$	-	-	Н.О.	
S <sup>0</sup>	-	-	н.о.	
$S_4O_6^{2-}$	-	+	-	
Присутствие и форма	+, IAq	+, IC	+, IC	
РБФК				
Источники углерода:				
Органические кислоты:		+	+	
Ацетат, сукцинат, малат,				
лактат, пируват, аконитат,	-			
оксалоацетат				

Таблица 5. Продолжение

Характеристики	1	2	3
Фумарат	-	-	+
Цитрат, изоцитрат,	-	Н.О.	-
глиоксилат, гликолат			
Формиат	-	+	-
Спирты:	-	+	+
Метанол, этанол, бутанол			
Углеводы:		+	-
Глюкоза, галактоза,			
арабиноза, раффиноза,	-		
сахароза, мальтоза,			
лактоза, сорбоза			
Аминокислоты:		н.о.	-
Глутамат, аспартат	-		
Серин, аспарагин	-	+	-
Триптофан, аланин,	-	+	+
гистидин, фенилаланин			
Полимерные	-	+	+
органические			
соединения:			
Пептон, дрожжевой			
экстракт			
Автотрофный рост	+	+	-
Гетеротрофный рост	-	+	+
Метилотрофный рост	-	+	+
Присутствие генов,	<b>DsrABEFHCMLJOP</b>	DsrEFHCMKJ	DsrEFHCMKJ
кодирующих комплекс	NR		
rDSR			
Доминирующие жирные	$C_{18:1\omega7}(37.6\%),$	$C_{18:1\omega7}(40.9\%),$	$C_{16:1}(25.4\%), C_{16:1}$
кислоты	$C_{16:0}(34.7\%)$ and	$C_{16:0}(32.9\%)$	$_{0}$ (16.2 %), C <sub>18:1</sub>
	$C_{16:1\omega7}(27.7\%)$	and $C_{16:1 \omega 7}$ (21.7	(53.3 %)**
		%)	
Хиноны	$UQ_6$	$UQ_6$	н.о.

\* только в микроаэробных условиях; \*\* данные для *В. alba* B15LD (Dubinina et al., 2017)

#### 5.1.4. Хемотаксономический анализ

Основными жирными кислотами являются C<sub>18:1 ω7</sub> (37.6 %), C<sub>16:0</sub> (34.7 %), и C<sub>16:1 ω7</sub> (27.7 %). Другие жирные кислоты присутствуют в минорных или следовых количествах (менее 5% общего содержания жирных кислот). Доминирующим дыхательным хиноном является UQ6.

#### 5.1.5. Филогенетический анализ

Штамм D3 формирует на дереве отдельную филогенетическую ветвь, кластеризующуюся с морскими представителями *Beggiatoa* (рис. 10). Уровень идентичности гена 16S рРНК штамма D3 с представителями семейства *Beggiatoaceae* составляет 86-88%, а с другими представителями порядка *Thiotrichales* - 83-86% (табл. 6). Это пороговое значение для выделения нового семейства (Yarza et al., 2014). Однако семейство *Beggiatoaceae* очень гетерогенно, и для очень ограниченного числа его представителей (всего для двух видов), доступны чистые культуры. Таким образом, на данный момент у нас недостаточно данных для реклассификации семейства, и мы ограничиваемся описанием штамма D3 в качестве представителя нового рода. Мы предлагаем классифицировать изученный организм, как *Thioflexithrix psekupsensis* gen. nov., sp. nov.

#### 5.1.6. Диагноз *Thioflexithrix* gen. nov.

*Thioflexithrix* (Thi.o.fle'xi.thrix. Gr. neut. n. *theion* cepa, L. masc. adj. *flexus* изогнутый, Gr. fem. n. *thrix* волос; N.L. fem. n. *Thioflexithrix*, серный изогнутый волос). Скользящая бесцветная серобактерия. Цилиндрические клетки объединены в трихомы. Сера запасается внутриклеточно. Клеточная стенка грамотрицательного типа. Облигатный хемолитоавтотрофный микроаэроб, использующий тиосульфат, сульфид или молекулярный водород в качестве доноров электронов. На основании филогенетического анализа гена 16S pPHK род относится к семейству *Beggiatoaceae*. Типовой вид *Thioflexithrix psekupsensis*.



Halothiobacillus neapolitanus Parker strain X (NR\_104929)

0,050

Рис. 10. Филогенетическое дерево, сконструированное на основании нуклеотидных последовательностей 16S рРНК методом Maximum-Likelihood, демонстрирующее положение нового рода *Thioflexithrix psekupsensis* D3<sup>T</sup>. Последовательность Гаммапротеобактерии *Halothiobacillus neapolitanus* использовалась в качестве внешней группы. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью "bootstrap" – анализа 1000 альтернативных деревьев. Масштаб, 0,05 замен на нуклеотидную позицию.

67

# 5.1.7. Диагноз Thioflexithrix psekupsensis sp. nov.

*Thioflexothrix psekupsensis* (pse.kups.en'sis N.L. fem. adj. *psekupsensis* в честь реки Псекупс в Краснодарском крае, Россия, в которую впадает термальный серный источник, из которого был выделен штамм D3)

Бесцветные цилиндрические клетки с закругленными концами, размер 2.4-2.7 ×3.4-3.9 мкм, формируют трихомы длиной до 200 мкм. Размножаются путем поперечного бинарного деления клеток в нитях. Нити образуют гормогонии путем формирования некридиальных участков. Нити и гормогонии способны к скользящему движению. Запасают внутриклеточно глобулы элементной серы. Клетки часто содержат внутриклеточные гранулы полифосфатов и поли-βгидроксиалканоата. Облигатный хемолитоавтотроф. Ацетат, сукцинат, малат, фумарат, оксалоацетат, цитрат, изоцитрат, лактат, формиат, пируват, аконат, глиоксилат, гликолят, метанол, этанол, бутанол, глюкоза, галактоза, арабиноза, раффиноза, сахароза, мальтоза, лактоза, сорбоза, глутамат, серин, аспартат, триптофан, аланин, гистидин, фенилаланин, аспарагин, пептон и дрожжевой экстракт не используются в качестве источников углерода. СО<sub>2</sub> ассимилируется через цикл Кальвина. РБФК относится к форме IAq. Может использовать в качестве доноров электронов тиосульфат, сульфид и молекулярный водород. Не использует в качестве доноров электронов  $CS_2$ ,  $S^0$ ,  $SO_3^{2-}$  и  $S_4O_6^{2-}$ . Штамм D3 – макроаэрофильный факультативный анаэроб. Способен к анаэробному дыханию на фумарате и ДМСО, и не способен дышать на сульфатах и нитратах.

В качестве источников азота утилизирует молекулярный азот, аммоний, нитрат, нитрит, пептон, гидролизат казеина, аспартат и дрожжевой экстракт. Не использует в качестве источника азота глутамат. Не гидролизует крахмал. Каталазаотрицательный. Оксидазаположительный. Рост осуществляется в пределах от 10 до 43 °C, с оптимумом при 32 °C. Диапазон pH для роста 6.8–7.6, оптимум - 7.2. Не способен расти при концентрации NaCl выше 2 %. Устойчив к рифампицину (100 мг/л). Г+Ц состав ДНК - 42.1 мол. %. Доминирующие жирные кислоты -  $C_{18:1 \omega7}$ ,  $C_{16:0}$ , и  $C_{16:1 \omega7}$ . Доминирующий дыхательный липохинон -UQ<sub>6</sub>. Типовой штамм D3 (=КСТС 62399 =UNIQEM U981), выделенный из бактериального серного мата из термального сероводородного источника в городе Горячий Ключ, Краснодарский край, Россия.

<u>F</u> - <u>A</u>		
Бактерия	Порядковыи	Уровень идентичности
	номер гена	гена 16S рРНК со
		штаммом D3
Beggiatoa alba	AF110274.1	87%
Beggiatoa sp. MS-81-1c	AF110276	88 %
Beggiatoa sp. Arauama II	GU117707	88 %
Beggiatoa sp. MS-81-6	AF110277	88 %
Beggiatoa sp. 35Flor	FR717278	88 %
Uncultured Beggiatoa sp. clone HMW-S2139	FR847884	88 %
Beggiatoa sp. OH-75-2a	AF110273	87 %
Beggiatoa alba	L40994	86 %
<i>Beggiatoa</i> sp. 401	AY583995	88 %
Beggiatoa leptomitoformis strain D-402	AY583996	87 %
Beggiatoa sp. LPN	EU015402	87 %
Beggiatoa sp. AA5A	AF110275	88 %
Beggiatoa sp. 1401-13	L40997	87 %
Beggiatoa sp. Arauama I	GU117706	88 %
"Candidatus Allobeggiatoa halophile"	EF428583	87 %
Leucothrix mucor strain LJS0601	EU025026	86 %
Beggiatoa sp. 'Carmel Canyon'	AY580013	87 %
"Candidatus Parabeggiatoa communis"	AF532774	87 %
"Candidatus Isobeggiatoa divolgata"	AF532769	86 %
"Candidatus Marithrix" sp. Canyon 246	KU942607	87 %
Thioploca ingrica	L40998	85 %
Beggiatoa sp. 'Bay of Concepcion'	AF035956	88 %
Cocleimonas flava strain KMM	NR_112909	85 %
Thiothrix nivea strain DSM 5205	NR_118036.1	84 %
Thiolinea disciformis strain B3-1	NR_024756.1	84 %
Thiofilum flexilis strain EJ2M-B	NR_024757.1	84 %
Thiomargarita namibiensis clone GER003	FR827867.1	88 %
"Candidatus Thiomargarita joergensenii" isolate NAM033	FR690923.1	87 %
"Candidatus Thiomargarita nelsonii" isolate Costa COS014	FN811662.1	88 %
"Candidatus Thiopilula" sp. ST-S116	FR847876.1	86 %
"Candidatus Thiophysa hinzei" isolate NAM091	FR690986.1	89 %
Achromatium oxaliferum (clone 5)	L42543.1	85 %
Piscirickettsia salmonis strain LF-89	NR_025980.1	84 %
Francisella noatunensis subsp. orientalis strain Ehime-1	NR 044552	83 %
Fastidiosibacteraceae bacterium strain SYSU SYW-6	MH329654.1	84 %

Таблица 6. Уровень идентичности генов 16S рРНК штамма D3 и других представителей порядка *Thiotrichales*.

# 5.1.8. Характеристика генома

Драфт-геном T. psekupsensis удалось собрать в 5 контигов общим размером 3 904 281  $\Gamma + \Pi$ рассчитанный геномной п.о. состав, на основании 42.1 %. Число последовательности, составил белок-кодирующих последовательностей составило 3331, из них 2185 с известными функциями и 1146 с неизвестными функциями. В геноме кодируется 60 РНК: 10 рРНК и 50 тРНК. Организация генов основных метаболических путей у *Thioflexithrix psekupsensis* D3<sup>T</sup>, обсуждаемых в данной работе, приведена на рисунке 11.

#### 5.1.9. Автотрофный рост

Штамм D3 является облигатным автотрофом. В его геноме были выявлены гены всех ферментов цикла Кальвина-Бенсона-Бассама, за исключением гена седогептулозо-1,7-бифосфатазы (табл. П1, рис. 11). Однако известно, что реакция, катализируемая седогептулозо-1,7-бифосфатазой, у бактерий может осуществляться фруктозо-1,6-бифосфатазой с двойной специфичностью к сахарам (Tamoi et al., 1996). Также отсутствует ген трансальдолазы, катализирующей превращение трех- и семиуглеродного фосфосахара в четырехи шестиуглеродный. Однако имеется ген транскетолазы, катализирующей превращение тех же исходных соединений в две пентозы.

В клетках *Thioflexithrix psekupsensis* D3<sup>т</sup> была выявлена активность ключевых ферментов цикла Кальвина-Бенсона-Бассама – РБФК и фосфорибулокиназы, а также вспомогательного фермента цикла – карбоангдразы. Значения активности приведены в таблице 7.

КЛСТКИХ	Thioficxini ix pseupsensis D5	
Фермент	Активность	
РБФК	$0,66\pm0,04$ мкмоль $\cdot$ мин $^{-1}$ $\cdot$ мг белка $^{-1}$	
Фосфорибулокиназа	$1,71\pm0,11$ мкмоль $\cdot$ мин $^{-1}$ $\cdot$ мг белка $^{-1}$	
Карбоангидраза	$44,00 \pm 2,10$ у.е. $\cdot$ мин <sup>-1</sup> мг белка <sup>-1</sup>	

Таблица 7. Активность ферментов автотрофной ассимиляции CO<sub>2</sub> в клетках *Thioflexithrix psekupsensis* D3<sup>T</sup>

Чтобы РБФК определить тип V штамма D3. был проведен филогенетический анализ белка RbcL (CbbL). На дереве, сконструированном по аминокислотным последовательностям RbcL (CbbL), штамм D3 кластеризуется с несколькими морскими нитчатыми представителями семейства *Beggiatoaceae* - Beggiatoa sp. 4572 84, Beggiatoa sp. PS, Beggiatoa sp. IS2, Thioploca ingrica – y которых функционирует РБФК формы IAq (рис. 12). Еще одно подтверждение формы РБФК в штамме D3 – расположение генов большой и малой субъединиц этого фермента в составе единого оперона с белком-активатором (Badger and Bek, 2008).



Рис. 11. Организация генов основных метаболических путей, обсуждаемых в данной работе, у *Thioflexithrix psekupsensis* D3<sup>T</sup>. Обозначения генов указаны в таблице П1.



Рис. 12. Филогенетическое дерево, сконструированное на основании аминокислотных последовательностей CbbL при помощи методов Neighbourjoining / Maximum-likelihood methods, демонстрирующее положение представителя нового рода *Thioflexithrix psekupsensis* D3<sup>T</sup>. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью "bootstrap" – анализа 1000 альтернативных деревьев. Масштаб, 0.05 / 0.1 замена на аминокислотную позицию.

#### 5.1.10. Серный метаболизм

В геноме *T. psekupsensis* обнаружены гены разветвленного пути окисления тиосульфата с образованием серы и сульфатов (SoxAXBYZ) (табл. П1). В геноме не было обнаружено отдельного гена, кодирующего белок SoxX, однако для представителей семейства *Beggiatoaceae* показана возможность функционирования гибридного белка SoxAX. Чтобы проверить наличие консервативных мотивов SoxX в составе SoxA было проведено выравнивание аминокислотной последовательности SoxA, SoxX, SoxAX других бактерий (рис. 13).

Один из сайтов связывания гема с (СХХСН, выделено желтым) расположен в предполагаемом домене SoxX и использует в качестве осевого лиганда метионин (выделен зеленым), что согласуется с данными по другим белкам SoxX (Kappler & Maher, 2013). Две другие гемовые группы располагаются в предполагаемом домене SoxA. С-терминальный гем-
связывающий сайт использует в качестве осевого лиганда цистеин (выделено красным) во всех известных на сегодняшний день белках SoxA (Kappler & Maher, 2013), включая белки представителей семейства Beggiatoaceae (Kreutzmann, 2013), в том числе и T. psekupsensis D3<sup>T</sup>. Напротив, N-концевой гемсайт SoxA (центральный связывающий связывающий сайт SoxAX) демонстрирует существенные различия. Kreutzmann обнаружила, что в последовательностях SoxAX у представителей семейства Beggiatoaceae второй осевой лиганд цистеин (выделен красным; Kappler & Maher, 2013) заменяется на гистидин (Kreutzmann, 2013). Мы обнаружили ту же самую замену в осевом лиганде последовательности SoxAX из T. psekupsensis D3<sup>T</sup>. Таким образом, выравнивание последовательностей позволило доказать наличие всех консервативных сайтов SoxX в SoxA и результаты выравнивания позволяют утверждать, что SoxAX функционирует в штамме D3, и, следовательно, комплекс Sox работает полностью.

Гены, кодирующие SoxCD, участвующие в неразветвленном пути окисления тиосульфата до сульфата, а также ген тиосульфатдегидрогеназы (Tsd), который окисляет тиосульфат до тетратионата, не были обнаружены; активность тиосульфатдегидрогеназы также не была выявлена. Гены Sox-комплекса в штамме D3 не образуют единый кластер, а кодируются в разных локусах (рис. 11). Это согласуется с литературными данными об оперонной организации генов, кодирующих Sox-комплекс в отсутствие *soxCD*.

Чтобы подтвердить механизм окисления тиосульфата у штамма D3 была изучена динамика окисления тиосульфата и накопления его продуктов в течение 72 часов (рис. 14). Было показано, что тиосульфат окисляется до элементной серы и сульфата в эквимолярных количествах. Активность SoxB составила 33,0 ± 1,7 нмоль · мин<sup>-1</sup> · мг белка<sup>-1</sup>.

		SOXX			
	MSSHLWHAAVVAMAIATPAICETAPKDVVAMAIATPAICETAPKDVDYAEGAVEASLTGVPGNPEEGVRVMTTNAL-GNCVAC				
	MFKGATQFSLPAAFAGLAVLAASAAAAGTVAPDSVPIEDMELSQSLTGVPGDPLAGREAFADRKK-GN <mark>CLAC</mark>				
K	MKYFLITSTGLALSLFLPTPLLAAEMSQAVPLELEKPAYVTPWKRYPHWNQSDWKDFSN-LKN-NNIRARSSSFQDIESPINGNPENGKKLVADRKRGGS <mark>CFSC</mark>				
	MGHQSQFIRYFIQTLSGASLLFAAQLTVSAAPMSGDVPLEIEQPAYQTPWKRYGNWPQEDWSQFNT-LDKPRTSIQAPPVGKMQPVPNPIVGDAENGKKLVADRSRGGS <mark>CYAC</mark>				
	VTPPQKFSDPLSCALPVSTSAAELSDKIALELEKPAHIAPWQRYKGWDSSDWKNYNN-LAQEVSPPVTPPQKFSDPLSCDAEKGQKLVADRSRGGS <mark>CYAC</mark>				
	MRFITSFYLVSVSVLLGSIPVVWAAEISSAVPLELKKPAYVSPWKRYKDWSSDNWSNFNS-LDKNSSPKVGKIKKIDKLAAGDAEKGKKLVADRSRGGS <mark>CYAC</mark>				
	MRFFTLILSLFTFITPLLAAEFSPDIPLDITKPSYANPWKRYKDWAKEDWKTFNT-LTESTSPAVGGLKKIDKPIEGNADNGKKLVADRSRGGG <mark>CYAC</mark>				
		soxA			
	SSLDPFENTAMFSLDLGEELFEM-OGPNGKS <mark>CODCH</mark> EAALKTOFTTWAATMPKFETRLNOVIGIEEFITR <mark>H</mark> ARATTGA-EYPSOSEENLGLAIYLRYLANGOPINIDOSDVNTOAAIKRG				
	$\label{eq:construction} DNLDLFENPGMLGOELGEOLYSV-AGPNGOSCASCHEKPA-OLFKTWATSMPRFEARLNKMLGIEEFITRHARATMDI-DYPMOSKONTGLSIYLRHLANGOAIAMDTSDPNTOAALARG$				
	DNLDEFTNPAMLSIEVGKNLFNQ-VGPMNKS <mark>CKNCH</mark> DDPK-ELFKTWATTMPQYEPRLKKMVGIEELITKHARATTGA-DYPVQTEDNLSLAIYLKYLANGQPIAIVTDDANTQAALKRA				
	DNLDEFTNPAMLSIEVGKNLFNQ-VGPMNKSCKNCHDDPK-ELFKTWATTMPQYEPRLKKMVGIEELITKHARATTGA-DYPVQTEDNLSLAIYLRYLANGOPIOINAGDKATKAALKKA ANLDAFENPAMFGTELGEKLFKO-TGATGKSCASCHEOAE-OAFKTWAASMPKYEPRLKKVVGVEEFVTRHAMATTGE-SYLAOSEENLGLAIYLRYLANGOPIOINAGDKATKAALKKG				
	DNLDEFTMFAMLSIEVGNLFNQ-VGFMNKSCANCHDDFK-ELFKTWAITGAEDKKWVGIEELITKHAKATTGA-DYFVQTEDNLSLAITLKYLANGQFIAIVTDJAALKKA ANLDAFENPAMFGTELGEKLFKQ-TGATGKSCASCHEQAE-QAFKTWAASMPKYEPRLKKVVGVEEFVTRHAMATTGE-SYLAQSEENLGLAIYLRYLANGQPIQINAGDKATKAALKRG DNLDFFENFCMFGTELGTSLFNK-VGATGKSCASCHENAT-KTFOOWAVTMPKYEPRLKKIMGVEEFITRHARATTGE-EYLAOSTENLGLAIYLRYLANGOTIOIKAEDANTKAALKRG				
	DNIDEFTMPAMLSIEVGNLFNQ-VGPMNKSCANCHDDFK-ELFKTWATTMPQTEPRLKKMVGIEELITRHAKATTGA-DYPVQTEDNISLAITLKYLANGQPIAIVTDDALKKA ANLDAFENPAMFGTELGEKLFKQ-TGATGKSCASCHEQAE-QAFKTWAASMPKYEPRLKKVVGVEEFVTRHAMATTGE-SYLAQSEENLGLAIYLRYLANGQPIQINAGDKATKAALKKG DNLDFFENPGMFGTELGFSLFNK-VGATGKSCASCHQEAT-KTFQQWAVTMPKYEPRLKKIMGVEEFITRHARATTGE-EYLAQSTENLGLAIYLRYLANGQTIQIKAEDANTKAALQRA MERDDFDNPAMVFVDRGLDAWNAAMGSNGESCASCHQFE-T-MAGLRAALPRVDETSGKLMILEDYVNACVTERMGLEKWGTTSEDMKDMLSLISLOSRGMAVNVAI-DGPAAHFWEOG				
	DNIDEFTMPAMLSIEVGNLFNQ-VGPMNKSCANCHDDFK-ELFKTWATTMPQTEPRLKKMVGIEELITRHAKATTGA-DYPVQTEDNISLAITLKYLANGQPIAIVTDDAALKAA ANLDAFENPAMFGTELGEKLFKQ-TGATGKSCASCHEQAE-QAFKTWAASMPKYEPRLKKVVGVEEFVTRHAMATTGE-SYLAQSEENLGLAIYLKYLANGQPIQINAGDKATKAALKRA DNLDPFENPGMFGTELGTSLFNK-VGATGKSCASCHEQAE-AFKTQQWAVTMPKYEPRLKKIMGVEEFITRHARATTGE-SYLAQSTENLGLAIYLKYLANGQPIQINAGDKATKAALKRA MERDDFDNPAMVFVDRGLDAWNAAMGSNGESCASCHQOPE-T-MAGLRAALPRVDETSGKLMILEDYVNAGVTERMGLEKWGTTSEDMKDMLSLISLQSRGMAVNVAI-DGPAAHFWEQG LEADSFONFGMLYVERGEEIWNTVDGAAGKSCASCHEDAE-SFLKGLGASYPKWNEDAGKPFNIELOINOCREONMOAEPYKFDAPDOKALTTYIKHOSLGMPMHVDLSEGEMOAWWEKG				
	DNIDEFTMFAMLSIEVGNLFNQ-VGFMNKSCANCHDDFK-ELFKTWAITMPQTEPRLKKMVGIEELITRHAKATTGA-DYPOTEDDISLAITLKYLANGQPIAIVTDJAALKAA ANLDAFENPAMFGTELGEKLFKQ-TGATGKSCASCHEQAE-QAFKTWAASMPKYEPRLKKVVGVEEFVTRHAMATTGE-SYLAQSEENLGLAIYLRYLANGQPIQINAGDKATKAALKRG DNLDFFENFCMFGTELGTSLFNK-VGATGKSCASCHENAT-KTFQQWAVTMPKYEPRLKKIMGVEEFITRHARATTGE-EYLAQSTENLGLAIYLRYLANGQTIQINAGDKATKAALKRG MERDDFDNPAMVFVDRGLDAWNAAMGSNGESCASCHQGPE-T-MAGLRAALPRVDETSGKLMILEDYVNAQVTERMGLEKWGTTSEDMKDMLSLISLQSRGMAVNVAI-DGPAHFWEQG LEADSFQNPGMLYVERGEEIWNTVDGAAGKSCASCHEDAE-SFLKGLGASYPKWNEDAGKPFNIELQINQCREQNMQAEPYKFDAPDQKALTTYIKHQSLGMPMHVDLSEGEMQAWWEKG				
	DNIDDEFTMFAMLSIEVGNLFNQ-VGFMNKSCANCHDDFK-ELFKTWATTMPQTEPRLKKMVGIEELITKHAKATTGA-DYPVQTEDDISLAITLKYLANGQPIAIVTDJAALKAA ANLDAFENPAMFGTELGEKLFKQ-TGATGKSCASCHEQAE-QAFKTWAASMPKYEPRLKKVVGVEEFVTRHAKATTGE-SYLAQSEENLGLAIYLRYLANGQPIQINAGDKATKAALKRG DNIDPFENPGMFGTELGTSLFNK-VGATGKSCASCHENAT-KTFQQWAVTMPKYEPRLKKIMGVEEFITRHARATTGE-SYLAQSEENLGLAIYLRYLANGQTIQIKAEDANTKAALQRA MERDDFDNPAMVFVDRGLDAWNAAMGSNGESCASCHQGPE-T-MAGLRAALPRVDETSGKLMILEDYVNAGVTERMGLEKWGTTSEDMKDMLSLISLQSRGMAVNVAI-DGPAAHFWEQG LEADSFQNPGMLYVERGEEIWNTVDGAAGKS <mark>CASCH</mark> EDAE-SFLKGLGASYPKWNEDAGKPFNIELQINQ <mark>G</mark> REQNMQAEPYKFDAPDQKALTTYIKHQSLGMPMHVDLSEGEMQAWWEKG				
	DNLDEFTMFAMLSIEVGNLFNQ-VGFMNKSCANCHDDFK-ELFKTWATTMPQTEPRLKKMVGIEELITRHAKATTGA-DYPVQTEDDLSLAIILKYLANGQPIAIVTDJAALKAA ANLDAFENPAMFGTELGEKLFKQ-TGATGKSCASCHEQAE-QAFKTWAASMPKYEPRLKKUVGVEEFVTRHAMATTGE-SYLAQSEENLGLAIYLRYLANGQPIQINAGDKATKAALKRG DNLDPFENPEMFGTELGEKLFKQ-TGATGKSCASCHENAT-KTFQQWAVTMPKYEPRLKKIMGVEEFIRHARATTGE-EYLAQSTENLGLAIYLRYLANGQTIQIKAEDANTKAALKRG MERDDFDNPAMVFVDRGLDAWNAAMGSNGESCASCHQGPE-T-MAGLRAALPRVDETSGKLMILEDYVNACVTERMGLEKWGTTSEDMKDMLSLISLQSRGMAVNVAI-DGPAAHFWEQG LEADSFQNPGMLYVERGEEIWNTVDGAAGKSCASCHEDAE-SFLKGLGASYPKWNEDAGKPFNIELQINQCREQNMQAEPYKFDAPDQKALTTYIKHQSLGMPMHVDLSEGEMQAWWEKG				
	DNLDEFTMFAMLSIEVGKNLFNQ-VGFMRKSCANCHDDFK-ELFKTWATTMPQTEPRLKKMVGIEELITRHAKATTGA-DYPOTEDNLSLAITLKYLANGQPIAIVTDDAKAA ANLDAFENPAMFGTELGEKLFKQ-TGATGKSCASCHEQAE-QAFKTWAASMPKYEPRLKKVVGVEEFVTRHAMATTGE-SYLAQSEENLGLAIYLRYLANGQPIQINAGDKATKAALKRG DNLDFFENPEMFGTELGESLFNK-VGATGKSCASCHENAT-KTFQQWAVTMPKYEPRLKKIMGVEEFIRHARATTGE-EYLAQSTENLGLAIYLRYLANGQTIQINAGDKATKAALKRG MERDDFDNPAMVFVDRGLDAWNAAMGSNGESCASCHQGPE-T-MAGLRAALPRVDETSGKLMILEDYVNAQVTERMGLEKWGTTSEDMKDMLSLISLQSRGMAVNVAI-DGPAAHFWEQG LEADSFQNPGMLYVERGEEIWNTVDGAAGKSCASCHEDAE-SFLKGLGASYPKWNEDAGKPFNIELQINQCREQNMQAEPYKFDAPDQKALTTYIKHQSLGMPMHVDLSEGEMQAWWEKG				
	DNLDEFTMFAMLSIEVGRNLFNQ-VGFMARSCARCHDDFK-ELFKTWATTMPQTEPRLKKNVGIEELITRHARATTGE-DYPVQTEDDLSLAITLKYLANGQPIQINAGDKATGAALKAG ANLDAFENPAMFGTELGEKLFKQ-TGATGKSCASCHEQAE-QAFKTWAASMPKVEPRLKKVUGVEEFVTRHAMATTGE-SYLAQSEENLGLAIYLRYLANGQTIQIKAEDANTKAALKRG DNLDFFENPGMFGTELGTSLFNK-VGATGKSCASCHENAT-KTFQQWAVTMPKYEPRLKKIMGVEEFITRHARATTGE-EYLAQSTENLGLAIYLRYLANGQTIQIKAEDANTKAALKRG MERDDFDNPAMVFVDRGLDAWNAAMGSNGESCASCHQGPE-T-MAGLRAALPRVDETSGKLMILEDYVNAGVTERMGLEKWGTTSEDMKDMLSLISLQSRGMAVNVAI-DGPAAHFWEQG LEADSFQNPGMLYVERGEEIWNTVDGAAGKSCASCHEDAE-SFLKGLGASYPKWNEDAGKPFNIELQINQCREQNMQAEPYKFDAPDQKALTTYIKHQSLGMPMHVDLSEGEMQAWWEKG 				
	DNLDEFTMFAMLSIEVGNLFNQ-VGFMNKSCANCHDDFK-ELEKTWAITMPQTEPRLKKNVGIEELITKHAKATTGA-DYPVQTEDDLSLAITLKILANGQPIQINAGDKATKAALKRG ANLDAFENPAMFGTELGEKLFKQ-TGATGKSCASCHEQAE-QAFKTWAASMPKYEPRLKKIVGVEEFVTRHAMATTGE-SYLAQSEENLGLAIYLRYLANGQPIQINAGDKATKAALKRG DNLDFFENPEMFGTELGEKLFKQ-VGATGKSCASCHENAT-KTFQQWAVTMPKYEPRLKKIMGVEEFITRHARATTGE-SYLAQSEENLGLAIYLRYLANGQTIQINAGDKATKAALKRG MERDDFDNPAMVFVDRGLDAWNAAMGSNGESCASCHQGPE-T-MAGLRAALPRVDETSGKLMILEDYVNAGVTERMGLEKWGTTSEDMKDMLSLISLQSRGMAVNVAI-DGPAAHFWEQG LEADSFQNPGMLYVERGEEIWNTVDGAAGKSCASCHEDAE-SFLKGLGASYPKWNEDAGKPFNIELQINQCREQNMQAEPYKFDAPDQKALTTYIKHQSLGMPMHVDLSEGEMQAWWEKG 				
	DNLDEFTMFAMLSIEVGNLFNQ-VGFMNKSCANCHDDFK-ELFKTWATTMPQTEPRLKKMVGTEELTTKHAKATTGA-DYPVQTEDDLSLAITLKYLANGQPIAIVTDJAADKAALKAG ANLDAFENPAMFGTELGEKLFKQ-TGATGKSCASCHEQAE-QAFKTWAASMPKYEPRLKKVVGVEEFVTRHAKATTGA-DYPVQTEDDLSLAITLKYLANGQPIQINAGDKATKAALKRG DNLDPFENPGMFGTELGEKLFKQ-TGATGKSCASCHENAT-KTTQQWAVTMPKYEPRLKKIMGVEEFITRHAKATTGE-SYLAQSEENLGLAIYLRYLANGQTIQINAGDKATKAALKRG MERDDFDNPAMVFVDRGLDAWNAAMGSNGESCASCHQGPE-T-MAGLRAALPRVDETSGKLMILEDVNAQVTERMGLEKWGTTSEDMKDMLSLISLQSRGMAVNVAI-DGPAAHFWEQG LEADSFQNPGMLYVERGEEIWNTVDGAAGKSCASCHEDAE-SFLKGLGASYPKWNEDAGKPFNIELQINQCREQNMQAEPYKFDAPDQKALTTYIKHQSLGMPMHVDLSEGEMQAWWEKG NALTQRKMGQLNFACMDCHGLLANRWIRGQYLVSMSSIYDHFPTYRTSRGEIWDIRKRQWCNVSIRANELPPNAPEYGDIEIYLATINQGQKLSVPGIRH EALSVVKLGQLNFACIDCHDFGAKRWIRGQYLSGVEGMIAHFPTYRTSRTEIWDIRKRLQWCGVAIRANELPPDAPEYGDIELFLNVKNNGKTFSVPGIRH EILVKRKVGQLNFACTDCHTVSANKWIRGQYLANTKAMLDHFPTYRTSRAEIWDIRKRLQWCGVAIRANELPPDAPEYGDLELYLAVAGQGQKLSVPGIRH EQLMTRKIGQUNFACTDCHVFGANHWIRGQYLSGFDGMLDHFPTYRTSRAEIWDIRKRLQWCGVANRANELPPDAPEYGDLELYLMQLSNGKNLSVPGIRH				
	DNLDEFTMFAMLSIEVGNLFNQ-VGFMIKSCANCHDDFK-ELFKTWAITMPQTEPRLKKMVGIEELITKHAKATTGA-DYPVQTEDDLSLAITLKYLANGQPIAIVTDDAGKAKAA ANLDAFENPAMFGTELGEKLFKQ-TGATGKSCASCHEQAE-QAFKTWAASMPKYEPRLKKVVGVEEFVTRHAMATTGE-SYLAQSEENLGLAIYLRYLANGQPIQINAGGKAKAALKRG DNLDFFENPGMFGTELGEKLFKQ-TGATGKSCASCHENAT-KTFQQWAVTMPKYEPRLKKIMGVEEFITRHARATTGE-SYLAQSEENLGLAIYLRYLANGQTIQINAGGKAKAALKRG MERDDFDNPAMVFVDRGLDAWNAAMGSNGESCASCHQGPE-T-MAGLRAALPRVDETSGKLMILEDYVNAQVTERMGLEKWGTTSEDMKDMLSLISLQSRGMAVNVAI-DGPAAHFWEQG LEADSFQNPGMLYVERGEEIWNTVDGAAGKSCASCHEDAE-SFLKGLGASYPKWNEDAGKPFNIELQINQCREQNMQAEPYKFDAPDQKALTTYIKHQSLGMPMHVDLSEGEMQAWWEKG 				
	DNLDEFTMFAMLSIEVGNLFNQ-VGFMNKSCANCHDDFK-ELFKTWATTMPQTEPRLKKNVGIEELTTRHAKATTGE-SYLAQSEENLGLAIYLKYLANGQPIQINAGDKATKAALKRG ANLDAFENPAMFGTELGEKLFKQ-VGATGKSCASCHENAT-KTFQQWAVTMPKYEPRLKKVUGVEEFVTRHAMATTGE-SYLAQSEENLGLAIYLKYLANGQPIQINAGDKATKAALKRG DNLDFFENPGMFGTELGEKLFKQ-VGATGKSCASCHENAT-KTFQQWAVTMPKYEPRLKKVUGVEEFVTRHAMATTGE-SYLAQSEENLGLAIYLKYLANGQTIQINAGDKATKAALKRG MERDDFDNPAMVFVDRGLDAWNAAMGSNGESCASCHENAT-KTFQQWAVTMPKYEPRLKKINGVEEFITRHARATTGE-SYLAQSEENLGLAIYLKYLANGQTIQIKAEDANTKAALKRG LEADSFQNPGMLYVERGEEIWNTVDGAAGKSCASCHEDAE-SFLKGLGASYPKWNEDAGKPFNIELQINQCREQNMQAEPYKFDAPDQKALTTYIKHQSLGMPMHVDLSEGEMQAWWEKG 				

Рис. 13. Выравнивание аминокислотной последовательности SoxAX представителей семейства *Beggiatoaceae* (Kreutzmann, 2013) с аминокислотными последовательностями SoxA типа I (классификация Kappler and Maher, 2013) и соответствующими последовательностями SoxX. Pde: *Paracoccus denitrificans* (WP\_011750382.1/WP\_011750379), Sag: *Stappia aggregata* (EAV42296/WP\_006937184), Bal: *Beggiatoa alba* B18LD (WP\_002691438.1), Ble: *Beggiatoa leptomitoformis* D-402<sup>T</sup> (ALG68158.1), BPS: *Beggiatoa* sp. PS (EDN69619.1), BIS: *Beggiatoa* sp. IS2 (OQW94375.1), Tps: *Thioflexithrix psekupsensis* D3<sup>T</sup> (WP\_086487844.1). Точки (.) в выравнивании – это отсутствующая информация, прочерки (-) обозначают пробелы. Предполагаемая последовательность SoxAX из генома *T. psekupsensis* D3<sup>T</sup> выделена жирным.



Рис. 14. Динамика окисления тиосульфата и образования продуктов его окисления у *T. psekupsensis* D3

Штамм D3 также способен к литоавтотрофному росту в присутствии сероводорода, который окисляется до элементной серы. В геноме были обнаружены гены, кодирующие SoxF (периплазматический белок) и Sqr (связанный с мембраной белок, ориентированный в периплазму), которые участвуют в окислении сульфида до элементной серы (Weissgerber, 2013), (табл. П1). Элементная сера может быть дополнительно окислена до сульфита с участием rDsr пути. Гены этого пути были закодированы в одном кластере, состоящем из 14 генов (*dsrABCEFHLMKJOPNR*). (Табл. П1, рис. 11). Ранее гены *dsrAB*, кодирующие каталитические субъединицы комплекса rDSR, были выявлены только в геномах морских представителей семейства *Beggiatoaceae*. *T. psekupsensis* – первый пресноводный представитель семейства, у которого присутствует полный набор генов данного комплекса.

Таким образом, окисление тиосульфата в штамме D3 происходит через путь SOX/DSR, который характеризуется отсутствием белков SoxCD и накоплением внутриклеточной серы, которая затем может окисляться комплексом rDSR.

Для штамма D3, как и для многих других представителей семейства *Beggiatoaceae*, механизм окисления сульфита до сульфата до конца не ясен. Гены *sor* и *soe*, кодирующие соответствующие ферменты прямого окисления

75

сульфита, связанного с окислительным фосфорилированием, а также гены *apr*, *sat* и *copT*, кодирующие АФС-редуктазу и разные типы АТФ-сульфурилазы (непрямое окисление сульфита, связанное с субстратным фосфорилированием), не были обнаружены в его геноме.

Общая схема серного метаболизма у *Thioflexithrix psekupsensis* D3 приведена на рисунке 15.



Рис. 15. Предполагаемая общая схема серного метаболизма у *Thioflexithrix* psekupsensis D3.

## 5.1.11. Литотрофный рост в присутствии молекулярного водорода

Штамм D3 способен к литотрофному росту в присутствии молекулярного водорода в качестве донора электронов для энергетического метаболизма. В его геноме были идентифицированы гены, кодирующие [NiFe] -гидрогеназу - *hyaA*, *hyaB*, *hyaCb*, а также гены *hyp*, участвующие в созревании [NiFe] -гидрогеназ (табл. П1). Активность гидрогеназы составила  $3,8 \pm 0,2$  мкмоль мин<sup>-1</sup> мг белка<sup>-1</sup>.

# 5.1.12. Определение количества экзополисахаридов (ЭПС) и их мономерного состава. Гены, кодирующие ферменты, участвующие в синтезе галактана

*T. psekupsensis* является микроаэрофильным факультативным анаэробом. В присутствии высокой концентрации кислорода происходит угнетение роста. При культивировании *T. psekupsensis* в лабораторных условиях вокруг филаментов наблюдалось образование явно визуализированного слоя экстраклеточной субстанции, предположительно полисахаридного происхождения (рис. 8).

Известно, что ЭПС бактерий характеризуются различной прочностью связывания с клеточной стенкой микроорганизмов. Мы использовали поэтапное ЭПС. фракций выделение возможных Сначала всех механическим 0.15 перемешиванием суспензии клеток В Μ NaCl была получена легкоотделяемая от клеточной стенки фракция (ЭПС1), а для получения прочносвязанной фракции (ЭПС2) мы воспользовались методом экстракции гликополимеров поверхности бактерий буфером, содержащим ЭДТАNа. Моносахаридный состав полученных препаратов ЭПС определяли методом ГЖХ. В результате анализа в составе ЭПС1 были идентифицированы рамноза (Rha), манноза (Man), глюкоза (Glc) и галактоза (Gal) (рис. 16).



Рис. 16. Моносахаридный состав ЭПС и сахаров, выделяемых *Thioflexithrix* в среду культивирования

Однако следует отметить, что данная фракция ЭПС помимо полисахаридов содержала также белки, среди которых могли присутствовать и гликопротеины. ЭПС1 Кроме того, нельзя исключать присутствия В продуктов жизнедеятельности бактерий, в частности различных углеводов, например, являющихся продуктами углеводного обмена в клетке глюкозы и маннозы. Поэтому данный препарат не позволил сделать однозначный вывод о составе ЭПС *T. psekupsensis*. Для многих грамотрицательных бактерий, представителем которых является T. psekupsensis, была отмечена прочная связь ЭПС с клеточной стенкой. В связи с этим нами была получена фракция клеточных стенок исследуемого организма, освобожденная от ассоциированных с ней белков. Отсутствие белков контролировали электрофорезом в ПААГ. Результат анализа моносахаридного состава ЭПС2 *Т. psekupsensis* позволил выявить присутствие единственного моносахарида – галактозы (Gal) (рис. 17).



Рис. 17. Моносахаридный состав ЭПС, прочно связанных с клеточной стенкой *T. psekupsensis* 

Для определения связей между остатками галактозы использовали метод ЯМР. Сигнал 4,58 м.д. (миллионная доля) относятся к протону при 1 атоме С бета-галактозы, 4.12 м.д. указывают на 1,4 гликозидную связь (рис. 18).



Рис. 18. Спектры ЯМР 1Н Сигнал 4,58 м.д. относятся к протону при 1 атоме С βгалактозы, 4.12 м.д. указывают на 1,4 гликозидную связь

В геноме *T. psekupsensis* были обнаружены гены, необходимые для синтеза галактана из глюкозо-6-фосфата (рис. 11, табл. П1). Они не образуют в геноме единого кластера, а располагаются разрозненно.

Мощные экзополисахаридные слои, образуемые вокруг нитей *T. psekupsensis* D3, вероятно, могут служить одним из механизмов защиты от кислорода, поскольку слизистые образования, как известно, создают условия, которые снижают скорость диффузии кислорода в клетки. Для подтверждения данного предположения мы измерили количество полисахаридов и белка при разных концентрациях кислорода (табл. 8).

Концентрация О2, %	С <sub>ЭПС</sub> *, мг/л	С <sub>белка</sub> **, мг/л	С <sub>белка</sub> : Сэпс	%С из НСО <sub>3</sub> - пошедший на синтез белка	%С из НСО <sub>3</sub> - пошедший на синтез ЭПС
1,5	$21,00 \pm 1,00$	$2,\!60 \pm 0,\!13$	1:8	$3,70 \pm 0,19$	29,60 ± 1,50
0,7	$15,\!00 \pm 0,\!75$	$2,30 \pm 0,11$	1:6,5	$3,20 \pm 0,16$	$21,10 \pm 1,00$
0,35	$14,\!00\pm0,\!70$	$2,\!15\pm0,\!12$	1:6	$3,\!10 \pm 0,\!16$	$19,\!70\pm1,\!00$

Таблица 8. Влияние кислородного режима культивирования на накопление белка и экзополисахаридов (ЭПС) у *T. psekupsensis* D3

\* - углерод полисахаридов рассчитывали как углерод глюкозы;

\*\* - углерод белка клеток рассчитывали согласно Nelson and Jannash, 1983.

Было показано, что количество углерода из  $CO_2$ , идущего на синтез белка, составляло около 3% и не зависело от концентрации кислорода. Количество углерода из  $CO_2$ , идущего на синтез полисахаридов, при разных концентрациях кислорода составляло от 20 до 30%. Оно уменьшалось на 10% при уменьшении концентрации  $O_2$  в 2 раза. Таким образом, на синтез экзополисахаридов *Thioflexithrix* использует в 10 раз больше углерода, чем на синтез белка, что свидетельствует о важности полисахаридов в жизнедеятельности данного микроорганизма.

Для того, чтобы доказать зависимость интенсивности синтеза ЭПС от концентрации кислорода в среде культивирования была также определена активность фермента фосфоглюкомутазы, превращающего глюкозо-6-фосфат в глюкозо-1-фосфат, одного из интермедиатов, участвующих в цепочке синтеза экзополисахаридов галактановой природы (табл. 9).

Таблица 9. Активность фосфоглюкомутазы у *T. psekupsensis* при разных концентрациях кислорода в среде культивирования

Концентрация кислорода в жидкости,	Активность фосфоглюкомутазы,
мг /л	мкмоль · мин <sup>-1</sup> · мг белка <sup>-1</sup>
$1,00 \pm 0,05$	$0,014 \pm 0,007$
$6,00 \pm 0,25$	$0,640 \pm 0,035$

При микроаэробном культивировании (конценстрация кислорода в газовой фазе 0,7%, концентрация кислорода в жидкой фазе 1,00  $\pm$  0,05 мг/л) активность фермента составила 0,014  $\pm$  0,007 мкмоль · мин<sup>-1</sup> · мг белка<sup>-1</sup>.

При обычном культивировании на градиентной питательной среде в нижнем слое содержится сульфид натрия, который химически связывает некоторое количество кислорода, диффундирующего в питательную среду из воздуха. Концентрация кислорода в жидкой фазе была определена по методу Винклера и составила  $6,00 \pm 0,25$  мг/л. Активность фосфоглюкомутазы при этом составила  $0,640 \pm 0,035$  мкмоль · мин<sup>-1</sup> · мг белка<sup>-1</sup>. Таким образом, при увеличении концентрации кислорода в жидкости в 6 раз активность фосфоглюкомутазы возрастает в 45 раз.

Таким образом, увеличение количества синтезируемых полисахаридов и увеличение активности фосфоглюкомутазы, участвующей в синтезе ЭПС, с возрастанием концентрации кислорода подтверждает, что полисахариды участвуют у *T. psekupsensis* в защите от кислородного стресса.

## 5.1.13. Ферменты, участвующие в защите от кислорода у *T. psekupsensis* D3<sup>T</sup>

Синтез антиоксидантных ферментов может быть еще одним механизмом защиты от избыточного содержания кислорода. В геноме были обнаружены гены нескольких антиоксидантных ферментов: *sodB* (кодирует Fe-зависимую супероксиддисмутазу (СОД), ЕС 1.15.1.1), *sodC* (кодирует Cu/Zn-зависимую СОД, ЕС 1.15.1.1) и *ccp* (кодирует цитохром c-551 пероксидазу, ЕС 1.11.1.5). Гены, кодирующие каталазу, в геноме не были обнаружены. Активность этого фермента также не удалось обнаружить. Активность пероксидазы и СОД определили при разных концентрациях кислорода в газовой фазе: 0,35 и 1,5 %. Было показано, что при увеличении концентрации кислорода активность цитохром- $c_{551}$  пероксидазы возрастает на 35 %, а активность СОД – на 55 % (табл. 10).

81

Концентрация О2 в	Активность фермента, мкмоль · мин <sup>-1</sup> · мг белка <sup>-1</sup>		
газовой фазе, %	СОД	Цитохом- <i>c</i> 551 пероксидаза	
0,35 % O <sub>2</sub>	$2,10 \pm 0,10$	$5,70 \pm 0,29$	
1,5 % O <sub>2</sub>	$3,26 \pm 0,16$	$8,70 \pm 0,44$	

Таблица 10. Активность ферментов антиоксидантной защиты у *Thioflexithrix* psekupsensis при разных концентрациях кислорода

## 5.1.14. Центральный метаболизм

*T. psekupsensis* обладает дыхательным типом метаболизма. В его геноме закодированы все гены гликолиза, ЦТК и глиоксилатного цикла. Для проверки функционирования ЦТК и глиоксилатного цикла у *T. psekupsensis* была определена активность большинства функционирующих в них ферментов. Значения активности приведены в таблице 11.

Таблица 11. Активность ферментов ЦТК и глиоксилатного цикла у *T*.

psenipsenisis			
Фермент	Активность, мкмоль · мин <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> белка		
Малатдегидрогеназа	$0,00480 \pm 0,00024$		
Изоцитратдегидрогеназа	$0,00060 \pm 0,00003$		
Фумаратгидратаза	$0,00540 \pm 0,00029$		
Сукцинатдегидрогеназа	$0,0040 \pm 0,0002$		
Аконитатгидратаза	$0,00080 \pm 0,00004$		
Изоцитратлиаза	$0,0128 \pm 0,0006$		

Выявленная активность ферментов на 2 порядка ниже, чем у гетеротрофных прокариот. Такая низкая активность ферментов, вероятно, обуславливает облигатную автотрофию у штамма D3.

## 5.1.15. Дыхательная цепь

В геноме *T. psekupsensis* D3 имеется полный набор генов для компонентов электронтранспортной цепи (табл. П1). В геноме также закодированы гены терминальных анаэробных редуктаз: ДМСО-редуктазы и фермента с двойной специфичностью: фумаратредуктазы / сукцинатдегидрогеназы.

Общая схема метаболических процессов у *Thioflexithrix psekupsensis* D3 приведена на рисунке 19.



Рис. 19. Общая схема метаболических процессов у *Thioflexithrix psekupsensis* D3<sup>T</sup>

# 5.2. Beggiatoa leptomitoformis D-402<sup>T</sup>

До 2017 года в состав семейства *Beggiatoaceae* входил единственный вид с валидно опубликованным названием, для которого была доступна чистая культура – *Beggiatoa alba*. В чистой культуре также поддерживался штамм *Beggiatoa* D-402, выделенный еще в 1980-ые годы Дубининой Г.А. и Саввичевым А.С., но ранее не описанный. Получение геномной последовательности для штамма D-402 дало возможность описать его как новый вид в составе рода *Beggiatoa* – *B. leptomitoformis*.

#### 5.2.1. Морфология клеток

Бесцветные цилиндрические клетки объединяются в трихомы длиной от 200 мкм до 1 см. Диаметр клеток в трихомах варьирует в зависимости от условий культивирования и составляет в среднем 1,5-2,5 мкм. При росте на градиенте H<sub>2</sub>S-O<sub>2</sub> диаметр клеток увеличивается до 2,7-3,0 мкм. Глобулы элементной серы накапливаются внутриклеточно при росте на градиентных средах, содержащих сульфиды (Na<sub>2</sub>S, CaS или FeS). Обильное накопление S<sup>o</sup> также наблюдается при культивировании штамма в присутствии тиосульфата, тетратионата, цистеина или сероорганических соединений.

Клетки имеют типичную грамотрицательную клеточную стенку. На ультратонких участках в периплазматическом пространстве и в инвагинациях цитоплазматической мембраны наблюдается отложение глобул элементной серы. Кроме серных глобул наблюдались внутриклеточные включения полифосфата и поли-β-гидроксиалканоата.

#### 5.2.2. Физиологические характеристики

D-402<sup>т</sup> был первым пресноводным штаммом *Beggiatoa*, способным к литоавтотрофному росту с использованием различных восстановленных соединений серы (сульфид, тиосульфат, тетратионат и тритионат) в качестве доноров электронов (Grabovich et al., 2001). Литоавтотрофный рост штамма D-402<sup>т</sup> происходил в микроаэробных условиях с концентрацией растворенного кислорода в среде, не более 0,5 мг/л (Патрицкая и др., 2001).

Наши данные свидетельствуют о высоком адаптивном потенциале штамма D-402<sup>т</sup>. В зависимости от окислительно-восстановительных условий среды, он может использовать органогетеротрофный, литоавтотрофный или миксотрофный тип метаболизма. Литоавтотрофный рост возможен только в микроаэробных условиях. Штамм может использовать различные органические соединения, соединения серы и водород в качестве доноров электронов.

Штамм D-402<sup>т</sup> может использовать широкий спектр органических субстратов для органотрофного роста: органические кислоты (ацетат, аконитат, пируват, лактат, малат, сукцинат и формиат), спирты (этанол, метанол и бутанол), углеводы (глюкоза, галактоза, арабиноза, раффиноза, сахароза, мальтоза, лактоза, сорбоза, левулоза, рибоза и ксилоза), аминокислоты (серин, триптофан, аланин, гистидин, фенилаланин, аспарагин, аргинин и валин), пептон и дрожжевой экстракт. В качестве источников азота штамм может использовать аммоний, нитрат, пептон, гидролизат казеина, аланин, аспартат, глутамат, серин, цистеин, цистин и метионин. Данный штамм также способен к фиксации молекулярного азота. Это подтверждается наличием в геноме всех генов нитрогеназного комплекса, увеличением уровня экспрессии маркерного гена азотфиксации *nifH* при культивировании на среде без источников азота по сравнению с полной средой (рис. 20). Также была определена активность нитрогеназы методом ацетилен-редукции. Она варьировала от 3 до 7 мкмоль этилена · ч<sup>-1</sup> · мг белка<sup>-1</sup>.



Рис. 20. Уровень экспрессии гена *nifH* на среде без источников азота и на полной среде. \* p < 0.05.

Штамм D-402<sup>т</sup> способен гидролизовать крахмал, является каталазаотрицательным и оксидазаположительным. Способен расти в диапазоне pH 6,0-8,2 с оптимумом при pH 7,5-7,8 и в температурном диапазоне 8-35°C с оптимумом при 28° C и при солености не более 0,3% NaCl. Организм устойчив к рифампицину (100 мг/л) и неомицину (10 мг/л).

Дифференциальные характеристики штамма D-402<sup>т</sup> и филогенетически близких пресноводных штаммов *Beggiatoa* приведены в таблице 12.

#### 5.2.3. Хемотаксономический анализ

Хемотаксономический анализ для штамма D-402<sup>т</sup> проводили в сравнении со штаммом типового вида рода *Beggiatoa* – *B. alba* B15LD. Профили жирных кислот этих штаммов были похожи. Преобладающими жирными кислотами были  $C_{18:1}$  (46,1 и 53,3%),  $C_{16:0}$  (15,5 и 16,2%) и  $C_{16:1}$  (32,9 и 25,4%) для штаммов D-402<sup>T</sup> и B15LD соответственно (табл. 13). Доминирующим дыхательным хиноном для штамма D-402 является UQ6. Данные о составе жирных кислот и хинонов других штаммов *Beggiatoa* отсутствуют.

# Таблица 12. Дифференциальные характеристики штамма D-402<sup>т</sup> и

филогенетически близких видов пресноводных членов рода Beggiatoa.

Штаммы: 1, D-402<sup>т</sup>, DSM 14946; 2, *B. alba* B15LD DSM 1416 (данные Mezzino et al., 1984; Kobayashi & Shibata, 1999); 3, *B. alba* B18LD<sup>T</sup> ATCC 33555 (данные Mezzino et al., 1984; Kobayashi & Shibata, 1999). «--», не выявлено; н.о., не определяли

Характеристики	1	2	3
Диаметр клетки, мкм / длина клетки, мкм	1.5-2.5	2.8-3.0	3.0-3.5
(максимальное значение, мкм)	(3.0)	(3.2)	(5.0)
Длина нитей, мкм	50-200	60-120	60-120
Диапазон (и оптимум) температуры °С	8-35 (28)	0-38	0-38
Диапазон (и оптимум) рН	6.0-8.2	7.0-7.3	7.0-7.3
	(7.5-7.8)	(7.2-7.3)	(7.2-7.3)
Диапазон (и оптимум) NaCl, %	Не более 0.3 %	< 1%	< 1%
Содержание Г+Ц в ДНК (мол. %)	42.1	40.0	41.1
восстановление S <sup>o</sup> или $S_2O_3^{2-}$ до $H_2S$	+	+	+
Отношение к О2	Аэроб,	Аэроб,	Аэроб,
	микроаэроб	микроаэроб	микроаэроб
Органические кислоты:			
Ацетат	+	+	+
Формиат	+	-	-
Фумарат	-	+	+
Глиоксилат	Н.О.	-	-
Изоцитрат	Н.О.	±	-
Лактат	+	+	+
Малат	+	+	+
Пируват	+	+	+
Сукцинат	+	+	+
Спирты: Этанол	+	+	+
Глицерол	-	-	-
Метанол	+	-	+*
Аминокислоты:			
Аспарагин	+	-	-
Аспартат	Н.О.	-	-
Глутамат	н.о.	-	-
Углеводы: глюкоза	+	-	-
Фиксация N <sub>2</sub>	+	+	+
Гидролиз крахмала	+	-	-
Каталаза	-	-	-
Оксидаза	+	+	+
Восстановление ДМСО	+	Н.О.	Н.О.
Окисление: Н2	+	-	-
$H_2S$	+	+	+
$S_2O_3^{-1}$	+	+	+
	+	-	-
ДМС, ДМСО, ТАА, ТДЕ	+	Н.О.	H.O.
Присутствие РБФК	+**	-	+***
Автотрофный рост	$+^{****}$	-	-

\*Jewell et al., 2008; \*\* GenBank ID ALG69257.1; \*\*\* GenBank ID EIJ41327.1; \*\*\*\* Патрицкая и др., 2001

Таблица 13. Сравнение жирнокислотного состава пресноводных штаммов D-402<sup>т</sup> и *B. alba* B15LD. Штаммы: 1, *Beggiatoa leptomitoformis* D-402<sup>т</sup>; 2, *B. alba* B15LD.

Жирная кислота	1	1
$C_{12:0}$	2.3	2.0
С <sub>12:03-ОН</sub>	1.1	1.2
$C_{14:0}$	2.2	1.9
C <sub>16:1</sub>	32.9	25.4
C <sub>16:0</sub>	15.5	16.2
$C_{18:1}$	46.1	53.3

Значения являются процентами от общего содержания жирных кислот и были получены в данном исследовании.

 $\Gamma$  + Ц в ДНК у Штамм D-402<sup>т</sup> составил 40,5 мол. %. Значение гибридизации ДНК-ДНК между штаммом D-402<sup>т</sup> и штаммом *B. alba* B15LD составило 33%.

# 5.2.4. Филогенетический анализ

Топология деревьев, построенных двумя методами, совпадает. Было показано, что штамм D-402<sup>т</sup> филогенетически наиболее близок к пресноводным представителям рода *Beggiatoa* и образует с ними отдельный филогенетический кластер (рис. 21). Уровень идентичности гена 16S рPHK штамма D-402 с ближайшими родственниками составил 98%, что указывает на межвидовые различия.

Белок-кодирующие гены также используются при определении новых видов. Поэтому функциональные гены *hsp60* были проанализированы в качестве дополнительных филогенетических маркеров для дифференциации таксонов на уровне видов и штаммов. Сходство нуклеотидных последовательностей гена *hsp60* (HQ909769) между D-402<sup>T</sup> и *B. alba* B18LDT (JF745935.1) составило 94%. На основе полифазного анализа мы предлагаем классифицировать изученный организм в составе нового рода *Beggiatoa,* как *B. leptomitoformis* sp. nov.



0.050/0.020

Рис. 21. Филогенетическое дерево, сконструированное на основании нуклеотидных последовательностей 16S pPHK методами Maximum-Likelihood / Neighbor-Joining, демонстрирующее положение нового вида **Beggiatoa** leptomitoformis D-402<sup>T</sup>. Последовательность Эпсилонпротеобактерии Sulfurospirillum barnesii SES-3 использовалась в качестве внешней группы. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью "bootstrap" – анализа 1000 альтернативных деревьев. Масштаб, 0,05 / 0,02 замены Джукса-Кантора на нуклеотидную позицию.

## 5.2.5. Диагноз Beggiatoa leptomitoformis sp. nov.

*Beggiatoa leptomitoformis* (lep.to.mi.to.for'mis. Gr. adj. leptos тонкий; Gr. masc. n. mitos нить; L. fem. n. forma форма; N.L. fem. adj. *leptomitoformis* в форме тонкой нити). Бесцветные цилиндрические клетки с закругленными концами, размер 1.0–2.5×3.5–4.0 мкм, формирует трихомы длиной до 50–200 мкм (до 1 см). Диаметр клеток зависит от условий роста (максимальный диаметр клеток – 3 мкм). Размножается путем поперечного бинарного деления клеток в нитях. Нити образуют гормогонии путем формирования некридиальных участков. Нити и гормогонии способны к скользящему движению. При росте в присутствии восстановленных соединений серы гранулы элементной серы накапливаются в периплазме и инвагинатах цитоплазматической мембраны. Внутриклеточная сера может использоваться в качестве акцептора электронов в отсутствии

кислорода. Клетки часто содержат гранулы полифосфатов или поли-βгидроксиалканоата. Организмы способны к литоавтотрофному росту в присутствии сульфида, элементной серы, тиосульфата, тетратионата, тритионата и молекулярного водорода. РБФК относится к типу ІС. При окислении сероорганических соединений (тиодиэтанол, тиоацетамид, диметилсульфид и ДМСО) сера запасается внутриклеточно. Способен использовать широкий спектр субстратов для органотрофного роста: органические кислоты (ацетат, акониат, пируват, лактат, малат, сукцинат и формиат), спирты (этанол, метанол и бутанол), углеводы (глюкоза, галактоза, арабиноза, раффиноза, сахароза, мальтоза, лактоза, сорбоза, левулоза, рибоза и ксилоза), аминокислоты (серин, триптофан, аланин, гистидин, фенилаланин, аспарагин, аргинин и валин), пептон дрожжевой экстракт. Молекулярный азот, аммоний, нитрат, пептон, И гидролизат казеина, аланин, аспартат, глутамат, серин, цистеин, цистин и метионин могут использоваться в качестве единственных источников азота. Гидролизует крахмал. Каталазаотрицательный. Оксидазаположительный. Растет при pH 6.0–8.2 с оптимумом при 7.5–7.8, при температуре 8–35 °C с оптимумом при 28 °C. Не способен расти при концентрации NaCl выше 0,3 % (w/v). Устойчив к рифампицину (100 мг/л) и неомицину (10 мг/л). Г+Ц состав ДНК 42.1 мол. %. Доминирующий дыхательный липохинон - UQ<sub>6</sub>.

Типовой штамм D-402 (=DSM 14946=UNIQEM U 779T), выделенный из пресноводного источника, загрязненного промышленными и сельскохозяйственными сточными водами.

#### 5.2.5. Характеристика генома

Геном *Beggiatoa leptomitoformis* D-402<sup>т</sup> представлен одной кольцевой хромосомой. Ее размер 4.27 мнл п.о., а средний Г+Ц состав - 40,5% (рис. 22). Число белок-кодирующих последовательностей составило 3453, из них 1915 с известными функциями и 1538 с неизвестными функциями. В геноме кодируется 47 тРНК, 8 нкРНК, и 6 рРНК. Средняя длина гена приблизительно равна 1025 пар оснований, а плотность генов составляет 0,86 гена на т.п.о. Организация

генов основных метаболических путей, обсуждаемых в данной работе, приведена на рисунке 23.



Рис. 22. Круговая карта хромосомы *B. leptomitoformis* D-402<sup>т</sup>. Две внешние дорожки показывают белок-кодирующие последовательности в прямом (пурпурный) и обратном (синий) направлениях.

Третья И четвертая дорожки показывают белок-кодирующие последовательности, отнесенные к подсистемам RAST. Цветовая легенда «Z» внизу объясняет цвета, используемые для обозначения подсистем (А, кофакторы, витамины, простетические группы, пигменты, В, клеточная стенка и капсула, С, вирулентность, заболевания и защита, D, обмен калия, E, разное, F, фаги, профаги, транспозиционные элементы, плазмиды, G, мембранный транспорт, H, усвоение и метаболизм железа, I, метаболизм РНК, J, нуклеозиды и нуклеотиды, К, белковый обмен, L, клеточное деление и клеточный цикл, М, регуляция и сигнализация клеток, N, метаболизм ДНК, жирные кислоты, липиды и изопреноиды, P, метаболизм азота, Q, покой и споруляция, R, дыхание, S, стрессреакция, Т, метаболизм ароматических соединений, U, Аминокислоты и их производные, V, метаболизм серы, W, метаболизм фосфора, X, углеводы). Дорожка 5 показывает гены, участвующие в метаболизме одноуглеродных соединений, цветовая легенда «У» объясняет используемые цвета (1, окисление метанола до формальдегида, 2, окисление формальдегида до CO<sup>2</sup>, 3, цикл Кальвина). На двух внутренних дорожках отображается GC-состав и GC-сдвиг.

Организация генов Sox-комплекса



Рис. 23. Организация генов основных метаболических путей, обсуждаемых в данной работе, у *Beggiatoa leptomitoformis* D-402<sup>т</sup>. Обозначения генов приведены в таблице П2.

## 5.2.6. Серный метаболизм

Гены, кодирующие ферменты, участвующие в окислении тиосульфата с образованием серы и сульфатов (Friedrich et al., 2001), были идентифицированы как гены Sox-системы (soxXBYZ) (табл. П2) с отсутствием генов soxCD. Они не образуют в геноме единого кластера, а закодированы в разных локусах (рис. 23). Ген, кодирующий цитохром с-типа, участвующий в окислении серы, SoxX, состоит из двух областей: «thiosulf SoxX» и «thiosulf SoxA». Следует отметить, что присутствие гибридных белков SoxAX у нескольких представителей семейства Beggiatoaceae было показано ранее (Kreutzmann, 2013). Чтобы проверить наличие консервативных мотивов SoxX а составе SoxA было проведено выравнивание аминокислотной последовательности SoxA Beggiatoa *leptomitoformis* с известными последовательностями SoxA, SoxX, SoxAX других бактерий (рис. 24). Обозначения консервативных мотивов приведены выше в описании аналогичного выравнивания для T. psekupsensis. Все консервативные мотивы SoxX были выявлены в составе SoxA. Они оказались идентичны аналогичным консервативным сайтам у T. psekupsensis. Следовательно, SoxAX функционирует в штамме D-402, и, следовательно, комплекс Sox работает полностью.

Активность Sox-комплекса в клетвах *B. leptomitoformis* D-402<sup>T</sup> была показана ранее. При автотрофном росте активность SoxB в клетках увеличивалась в 5-10 раз по сравнению с литогеротрофным ростом (Grabovich et al., 2001).

Активность тиосульфатдегидрогеназы не была выявлена у B. *leptomitoformis* D-402<sup>T</sup> биохимическими методами, и ген *tsdA* не был обнаружен.

Было установлено, что *B. leptomitoformis* D-402<sup>т</sup> может использовать, кроме тиосульфата, также сульфид в качестве донора электронов для литотрофного роста.

Sovy

			00///
SoxX	Pde		TAPKDVDYAEGAVEASLTGVPGNPEEGVRVMTTNAL-GN <mark>CVACH</mark> QIG
SoxX	Sag	MFKGATQFSLPAAFAGLAVLAASAAAAG	VAPDSVPIEDMELSQSLTGVPGDPLAGREAFADRKK-GN <mark>CLACH</mark> ANA
SoxAX	BPS	MKYFLITSTGLALSLFLPTPLLAAEMSQAVPLELEKPAYVTPWKRYPHWNQSDWKDFSNLK	NNIRARSSSFQDIESPINGNPENGKKLVADRKRGGS <mark>CFSCH</mark> ILP
SoxAX	Bal	RFITSFYLVSVSVLLGSIPVVWAAEISSAVPLELKKPAYVSPWKRYKDWSSDNWSNFNSLD	KNSSPKVGKIKKIDKLAAGDAEKGKKLVADRSRGGS <mark>CYACH</mark> VMP
SoxAX	Ble	MRFFTL-ILSLFTFITPLLAAEFSPDIPLDITKPSYANPWKRYKDWAKEDWKTFNTLT	ESTSPAVGGLKKIDKPIEGNADNGKKLVADRSRGGG <mark>CYACH</mark> VMP
SoxA	Pde		
SoxA	Sag		
SoxX	Pde	ALPDVEFPGTIAPPLDGAADRWTEAQLRGIVANAKMTFE-GTFMPAFYKGEGFVRPGDGFTGKAG	EPLAPILNAQQIEDVVAFLVTLKE
SoxX	Sag	DLSDQLFHGEVGPVLDGAADRWSEAQLRAIVVNSKDVFGDQTIMPGFYTLKVGINVDEEFAGK	TILSAQEVEDVVAYLLTLKEN
SoxAX	BPS	DGSMPGNIGPALSMIGI-WNRSDERLFNYIYDARQY-NPNTVMPPWGAH	GLYTKAEIKDIVSYLQTLKQPINFSNPQDNPATRRAPDEDKHS
SoxAX	Bal	NANLAGNIAPDLSTVAT-WGRTDEHLFNYIYDPRVY-NPASVMPPWGAH	QVFSDAEIMDIVAYLKTLNKATQFTDDKENPKTRPVPVETR-A
SoxAX	Ble	GATLPGNVAPDLSTVAT-WGRTDEHLFNYIDDPRRY-NPTTVMPPWGAH	QVFTEAEIMDIVSYLKTLKTPSKFADNKENPQTRPVPVEDR-D
SoxA	Pde	RFTKTKGTLAATALGLALAGAAF-AEPAEDELVIETDDGPVEIATRTTPPAFLAD	T-FDEIYSGWLFRDDTTRDM
SoxA	Sag	MLAALMVSTSASLA-GGPVDEKLVIDGELEIDTRVPAPEGH	P-FDELISGWHYRTDETRDL
			SoxA
SoxX	Pde		
SoxX	Sag		
SoxAX	BPS	SLDPFENTAMFSLDLGEELFEM-QGPNGKS <mark>CQDCH</mark> EAALKTQFTTWAATMPKFETRLNQVIGIEEFITR <mark>H</mark> AR <i>I</i>	ATTG-AEYPSQSEENLGLAIYLRYLANGQPINIDQSDVNTQAAIKRGN
SoxAX	Bal	NLDAFENPAMFGTELGEKLFKO-TGATGKS <mark>CASCH</mark> EOAEO-AFKTWAASMPKYEPRLKKVVGVEEFVTRHAM	ATTG-ESYLAOSEENLGLAIYLRYLANGOPIOINAGDKATKAALKRGE
SoxAX	Ble	NLDPFENPGMFGTELGTSLFNK-VGATGKSCASCHENATK-TFOOWAVTMPKYEPRLKKIMGVEEFITRHAR	TTG-EEYLAOSTENLGLAIYLRYLANGOTIOIKAEDANTKAALORAE
SoxA	Pde	ERDDFDNPAMVFVDRGLDAWNAAMGSNGESCASCHOGPETMAGLRAALPRVDETSGKLMILEDYVNACVT	RMGLEKWGTTSEDMKDMLSLISLOSRGMAVNVAI-DGPAAHFWEOGR
SoxA	Sag	EADSFONPGMLYVERGEEIWNTVDGAAGKSCASCHEDAES-FLKGLGASYPKWNEDAGKPFNIELOINOORE	NMOAEPYKFDAPDOKALTTYIKHOSLGMPMHVDLSEGEMOAWWEKGK
	<u> </u>		~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~
SoxX	Pde		
SoxX	Sag		
SoxAX	BPS	ALTQRKMGQLNFA <mark>CMDCH</mark> GLLANRWIRGQYLVSMSSIYDHFPTYRTSRGEIWDIRKRFQW <mark>C</mark> NVSIRANELPPI	IAPEYGDIEIYLATINQGQKLSVPGIRH
SoxAX	Bal	QLMTRKIGQLNFA <mark>CNDCH</mark> VFGANHWVRGQYLSGFDGMLDHFPTYRTSRAEIWDIRKRLQWCGVAVRANELPP	DAPEYGDIELYLMQLSNGKNLSVPGIRH
SoxAX	Ble	QLMKRKIGQLNFS <mark>CNDCH</mark> DFGANHWIRGQYLSGLTGMIDHFPTYRTSRAEIWDIRKRLQW <mark>C</mark> GVAIRANELPPI	DAAVYGDIELYLMQVNNGKVFSVPGIRH
SoxA	Pde	EIYYTRYGOLEMS <mark>CANCH</mark> EDNYGNMIRADHLSOGOVNGFPTYRLKDAGMVTAOORFVGVRDTRAETFKA	
	~		

Рис. 24. Выравнивание аминокислотной последовательности SoxAX представителей семейства *Beggiatoaceae* (Kreutzmann, 2013) с аминокислотными последовательностями SoxA типа I (классификация Kappler and Maher, 2013) и соответствующими последовательностями SoxX. Pde: *Paracoccus denitrificans* (WP\_011750382.1/WP\_011750379), Sag: *Stappia aggregata* (EAV42296/WP\_006937184), Bal: *Beggiatoa alba* B18LD (WP\_002691438.1), Ble - *Beggiatoa leptomitoformis* D-402<sup>T</sup> (ALG68158.1), BPS – *Beggiatoa* sp. PS (BOGUAY\_3083). Точки (.) в выравнивании – это отсутствующая информация, прочерки (-) обозначают пробелы. Предполагаемая последовательность SoxAX из генома *Beggiatoa leptomitoformis* D-402<sup>T</sup> выделена жирным.

Геномный анализ штамма D-402<sup>T</sup> выявил гены следующих ферментов, участвующих в окислении сульфидов до серы: сульфид-хиноноксидоредуктазы и сульфид-дегидрогеназы (флавоцитохром с) (ЕС 1.8.2.-)] (табл. П2). Механизм окисления серы до сульфита и сульфита до сульфата остается неясным, т.к. не были выявлены гены, участвующие в окислении сульфита до сульфатов, а также отсутствуют гены *dsrAB*, кодирующие каталитические субъединицы rDsrкомплекса, ответственного за окисление серы до сульфита.

Помимо неорганических соединений серы, штамм D-402<sup>т</sup> может расти с некоторыми сероорганическими соединениями: диметилсульфидом, тиофеновым 2-ацетатом или тиодиэтанолом (Kelly et al., 1994).

Общая схема серного метаболизма штамма D-402<sup>т</sup>, сконструированая на основании геномных и экспериментальных данных, приведена на рисунке 25.



Рис. 25. Предполагаемая общая схема серного метаболизма у B. *leptomitoformis* D-402<sup>T</sup>

## 5.2.7. Литотрофный рост в присутствии молекулярного водорода

Штамм D-402<sup>т</sup> также способен к литотрофному росту в присутствии молекулярного водорода. Было обнаружено, что *B. leptomitoformis* D-402<sup>т</sup>

содержит гены *hyaAB* (табл. П2), которые кодируют большую и малую каталитические субъединицы мембрансвязанной [NiFe] -гидрогеназы группы I (Volbeda et al., 1995; Vignais et al., 2001).

## 5.2.8. Метаболизм С<sub>1</sub>-соединений

## 5.2.8.1. Окисление С<sub>1</sub>-соединений до СО<sub>2</sub>

В геноме *B. leptomitoformis* D-402<sup>т</sup> не было обнаружено генов метанмонооксигеназ и не был зарегистрирован рост в присутствии метана.

## 5.2.8.2. Окисление метанола до формальдегида

В геноме *В. leptomitoformis* D-402 были обнаружены гены, кодирующие две PQQ-зависимые дегидрогеназы семейства метанол / этанол, WP\_062154153.1 и WP\_062149546.1 (табл. П2).

Первая последовательность (WP\_062154153.1) имеет высокий уровень идентичности с белками метанолдегидрогеназы ХохF-типа, а вторая последовательность (WP\_062149546.1) обладает высоким уровнем идентичности с белками метанолдегидрогеназ Mdh2 (табл. 14).

Таблица 14. Идентичность между белками двух PQQ-зависимых дегидрогеназ семейства метанол / этанол у *B. leptomitoformis* D-402 и *B.alba* и типичных метилотрофов

типи шых метилотрофов				
Номер PQQ-	Номер	Название	Идентичность,	Тип метанол-
зависимой	метанол-	сравниваемой	%	дегидрогеназы
дегидрогеназы	дегидрогеназы	бактерии		в сравниваемой
семейства	сравниваемой			бактерии
метанол /	бактерии			
этанол у <i>В</i> .				
leptomitoformis				
D-402				
WP_062154153	WP_002682507	B. alba	92	XoxF
	ACS40517	Methylobacterium	68	
		extorquens AM1		
	ABA78735	Rhodobacter	74	
		sphaeroides 2.4.1		
	WP_011746370	Paracoccus	70	
		denitrificans		
WP_062149546	EGK72216	Methyloversatilis	66	Mdh2*
		universalis FAM5		

\* *Methyloversatilis universalis* FAM5 принадлежит к порядку *Rhodocyclales*. Присутствие МДГ типа Mdh2 свойственно всем представителям данного порядка.

Исходя из этих данных, мы пришли к выводу, что геном B. leptomitoformis D-402 содержит гены mdh2 и xoxF, ответственные за синтез PQQ-зависимых Для функционирования метанолдегидрогеназ. данного типа ферментов необходим кофермент PQQ. Все гены, необходимые для его биосинтеза, закодированы в составе одного оперона *радАВСДЕ* (табл. П2, рис. 23). Аминокислотные последовательности белков биосинтеза РОО имели высокий уровень гомологии с белками типичного метилотрофа Methylobacterium extorquens AM1 и штамма B. alba B18LD, для которого ранее была показана способность к метилотрофному росту (30-71% и 84-100% соответственно) (табл. 15). В то же время кластер генов, необходимых для функционирования классической метанолдегидрогеназы MxaF отсутствовал в геноме D-402, а также в геноме *B. alba* B18LD. В статье, посвященной описанию метилотрофного роста B. alba (Jewell et al., 2008), были обнаружены только гены метанолдегидрогеназы типа XoxF. Однако в ходе анализа генома мы обнаружили ген Mdh2метанолдегидрогеназы (WP\_002685746.1) в В. alba. Это прямое доказательство того, что два вида пресноводных *Beggiatoa* имеют один и тот же тип метанолдегидрогеназ.

Таблица 15. Идентичность между белками Рqq-кластеров у *B*. leptomitoformis D-402 и Methylobacterium extorquens AM1 и Beggiatoa alba B18LD

Белок	Номер у <i>М</i> .	Идентиность,	Номер у <i>B. alba</i>	Идентичность,
	extorquens AM1	%	B18LD	%
PqqA	WP_015857429.1	71	WP_002684738.1	100
PqqB	ACS39594.1	32	WP_002684739.1	89
PqqC	WP_012752611.1	47	WP_002683015.1	94
PqqD	WP_012752611.1	30	WP_002683014.1	84
PqqE	AAB58898.1	46	WP_002683013.1	93

## 5.2.8.3. Окисление формальдегида до формиата и СО2

В геноме штамма D-402 имеются гены, кодирующие ферменты тетрагидрометаноптеринового (ТГМП) пути окисления формальдегида до формиата. Они не образуют единого кластера, а находятся на большом расстоянии друг от друга (рис. 23). Напротив, гены NAD-зависимой формиатдегидрогеназы, ответственной за дальнейшее окисление формиата до CO<sub>2</sub>, *fdh2ABCD*, были расположены в одном кластере (табл. П2, рис. 23).

Аминокислотные последовательности ферментов, ответственных за окисление формальдегида до CO<sub>2</sub>, были на 30-70% идентичны тем же ферментам из типичного метилотрофа *M. extorquens* AM1 и на 66-93%, идентичны ферментам из метилотрофного штамма *B. alba* B18LD (табл. 16).

Таблица 16. Идентичность белков, принимающих участие в окислении формальдегида до CO<sub>2</sub> у *B. leptomitoformis* D-402 и *Methylobacterium extorquens* AM1 и *B. alba* B18LD

Белок	M. extorquen.	s AM1	B. alba B18LD	
	Номер	Идентичность,	Номер	Идентичность,
	последовательности	%	последовательности	%
	Тет	рагидрометанопт	ериновый путь	
Fae	AAG32954.1	67	EIJ44303.1	93
MtdB	ACS39572.1	30	EIJ42041.1	91
Mch	AAC27022.1	55	EIJ42043.1	91
FhcA	AAG32950.2	42	EIJ41926.1	92
FhcB	AAG32951.1	30	EIJ43238.1	66
FhcC	ACS39599.1	39	EIJ43681.1	80
FhcD	ABY30224.1	52	EIJ43680.1	90
MptG	ACS39603.1	50	WP_002685517.1	77
		Формиатдегид	рогеназа	
Fdh2A	AAO32146.1	70	WP_002691892.1	92
Fdh2B	AAO32145.1	61	WP_002691890.1	93
Fdh2C	AAO32144.1	46	WP_002691888.1	87
Fdh2D	AAO32147.1	40	WP 002691894.1	84

#### 5.2.8.4. Рост В. leptomitoformis D-402 в присутствии метанола

*B. leptomitoformis* D-402 демонстрировал стабильный рост в аэробных условиях в течение нескольких пассажей с метанолом в качестве единственного источника углерода и энергии. Прирост белка составил 12,0 ± 0,6 мг/л.

Известно, что высокоактивные метанолдегидрогеназы типа XoxF проявляют активность в присутствии редкоземельных металлов-лантаноидов (Chu et al. 2016; Hibi et al. 2011; Nakagawa et al. 2012). Таким образом, добавление лантаноидов в питательную среду может стимулировать рост метилотрофов. В нашем случае добавление хлорида лантана (III) действительно приводило к увеличению биомассы 2,75 раза, при этом прирост белка составил  $33,0 \pm 1,5$  мг/л.

Таким образом, прирост белка при метилотрофном культивировании *В. leptomitoformis* D-402 сопоставим с приростом белка при литогеротрофном росте (Грабович и др., 1998), когда накапливается максимальная биомасса.

Ранее было показано, что при литоавтотрофном росте тиосульфат окисляется до S<sup>0</sup>, которая внутриклеточно накапливается в периплазме, и SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Dubinina et al., 2017) (рис. 26 A). После 2-3 пассажей бактерий на среде с метанолом, но без тиосульфата, серные глобулы исчезали (рис. 26 Б), бактерии переходили от литотрофного роста к метилотрофному росту.



Рис. 26. Морфология *В. leptomitoformis* D-402<sup>т</sup> при культивировании в литотрофных (А) и метилотрофных (Б) условиях.

## 5.2.8.5. Активность метанолдегидрогеназы и формиатдегидрогеназы

Активность метанолдегидрогеназы (общая активность XoxF и Mdh2) и формиатдегидрогеназы составила 35,00 ± 1,75 и 0,07 ± 0,01 мкмоль мин<sup>-1</sup> мг белка<sup>-1</sup>, соответственно. В присутствии La (III) общая активность метанолдегидрогеназы и формиатдегидрогеназы увеличивалась в 2,6 и 3,5 раза, соответственно (табл. 17). Мы предполагаем, что увеличение активности XoxF в присутствии La (III) привело к увеличению концентрации конечного продукта реакции, формальдегида, что привело к увеличению количества промежуточных продуктов ТГМП-пути.

Таблица 17. Активность метанолдегидрогеназы и формиатдегидрогеназы,

	Метанолдегидрогеназа (Mdh2 + XoxF)	Формиатдегидрогеназа
-LaCl <sub>3</sub>	$35,00 \pm 1,75$	$0,\!07 \pm 0,\!01$
$+LaCl_3$	$91,00 \pm 5,25$	$0,25 \pm 0,01$

мкмоль мин<sup>-1</sup> мг белка<sup>-1</sup>

Это, в свою очередь, привело к увеличению концентрации формиата. Таким образом, добавление La (III) управляет механизмом каскадного увеличения конечных продуктов реакции и, как следствие, повышением эффективности ассимиляции метанола.

#### 5.2.8.6. Уровень экспрессии генов mdh2 и xoxF

Количественный ПЦР анализ продемонстрировал увеличение экспрессии mdh2 и xoxF в 1,6 и 2 раза при метилотрофном росте по сравнению с литогетеротрофным ростом (рис. 27). Уровень экспрессии гена xoxF при метилотрофном росте в присутствии La (III) был в 2,2 раза выше по сравнению с метилотрофным ростом без La (III) (рис. 27).



Рис. 27. Уровень экспрессии генов *prkB*, *rbcL*, *xoxF* и *mdh2* при литогетеротрофном росте, метилотрофном росте без La (III), и метилотрофном росте с La (III). Гены 16S рРНК и *gyrB* использовались в качестве референсов. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01.

Эти результаты согласуются с ранее описанным влиянием редкоземельных металлов на активность МДГ ХохF-типа (Chu et al., 2016; Hibi et al., 2011; Nakagawa et al., 2012).

#### **5.2.8.7.** Ассимиляция углерода из С<sub>1</sub>-соединений для анаболизма

Для бактерий известно три основных пути усвоения углерода для анаболизма при метилотрофном росте: рибулозомонофосфатный (РМФ) цикл, сериновый цикл и цикл Кальвина-Бенсона-Бассама (Троценко и др., 2008).

Гены, кодирующие ключевые ферменты РМФ цикла, гексулозо-6фосфатсинтазу (hxlA) и фосфогексулозоизомеразу (hxlB) и несколько ферментов серинового цикла: серин-глиоксилат-аминотрансферазу (sga), глицераткиназу (gck) и малил-СоА-лиазу (mcl) - не были обнаружены в геноме *B. leptomitoformis*. Таким образом, эти циклы, по-видимому, не могут функционировать в штаме D-402.

Однако был обнаружен полный набор генов для цикла Кальвина-Бенсона-Бассама (табл. П2). Следует отметить, что ген, кодирующий седогептулозо-1,7бифосфатазу, отсутствует в геноме *B. leptomitoformis*, но у бактерий его функцию может выполнять фруктозо-1,6-бифосфатаза с двойной специфичностью к сахарам (Tamoi et al., 1996). Также отсутствует ген трансальдолазы, катализирующей превращение трех- и семиуглеродного фосфосахара в четырехи шестиуглеродный. Однако имеется ген транскетолазы, катализирующей превращение тех же исходных соединений в две пентозы.

Гены цикла Кальвина-Бенсона-Бассама не образуют в геноме единого кластера (рис. 23).

С использованием культуральных и биохимических подходов ранее было показано, что *B. leptomitoformis* D-402 может расти литоавтотрофно только в микроаэробных условиях (Grabovich et al., 2001). Поэтому, чтобы подтвердить функционирование цикла Кальвина, мы определили уровень экспрессии генов, кодирующих его ключевые ферменты, *prkB* и *rbcL*, при микроаэробном культивировании. Количественный ПЦР анализ продемонстрировал, что в микроаэробных литоавтотрофных условиях уровни *prkB*- и *rbcL*-мPHK были в 3

и 9,5 раза и в 4 и 13 раз выше, чем в литогетеро- и органогетеротрофных условиях соответственно (рис. 28).



Рис. 28. Уровень экспресии генов *prkB* и *rbcL* при органогетеротрофном, литогетеротрофном и литоавтотрофном микроаэробном росте. Гены 16S рРНК и *gyrB* использовались в качестве референсов. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01.

Был обнаружен метилотрофный аэробный рост, поэтому было решено выяснить механизм ассимиляции CO<sub>2</sub> при аэробном росте. С этой целью мы оценили активность одного из ключевых ферментов для усвоения СО2 через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама, фосфорибулокиназы, при метилотрофном росте. Чтобы подтвердить приведенное выше предположение о влиянии La (III) превращения С<sub>1</sub>-соединений, путь ΜЫ измерили активность на весь фосфорибулокиназы с La (III) и без него. При метилотрофном росте в аэробных условиях с La (III) активность фосфорибулокиназы была в 1,6 раза выше, чем без La (III), и имела значение  $2,1 \pm 0,1$  мкмоль мин<sup>-1</sup> мг белка<sup>-1</sup>. Активность фосфорибулокиназы при аэробном метилотрофном росте сопоставима с активностью этого фермента при литоавтотрофном микроаэробном росте с тиосульфатом (Grabovich et al., 2001), что косвенно поддерживает функционирование цикла Кальвина-Бенсона-Бассама при метилотрофном росте в аэробных условиях.

Для дальнейшего подтверждения усвоения CO<sub>2</sub> через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама мы использовали количественный ПЦР анализ, который показал, что уровни *prkB*- и *rbcL*-мРНК при метилотрофном аэробном культивировании были примерно в 10 раз выше, чем при литогетеротрофном культивировании (рис. 27).

Таким образом, мы показали, что штамм D-402<sup>T</sup> способен к метилотрофному росту в аэробных условиях и может окислять метанол до CO<sub>2</sub> в три этапа: метанол окисляется до формальдегида двумя PQQ-зависимыми метанолдегидрогеназами, XoxF и Mdh2; формальдегид далее окисляется до формиата по TГМП пути, а формиат превращается в CO<sub>2</sub> с помощью NADзависимой формиатдегидрогеназы. Было показано, что источником углерода для конструктивного метаболизма служит CO<sub>2</sub>, ассимилированный через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама.

#### 5.2.9. Центральный метаболизм

В. leptomitoformis использует дыхательный тип метаболизма. В его геноме был выявлен полный набор генов, кодирующих ферменты гликолиза, ЦТК и глиоксилатного цикла (табл. П2). Выявление в геноме соответствующих генов служит подтверждением полученных ранее данных об активности соответствующих ферментов (Грабович и др., 1998).

## 5.2.10. Дыхательная цепь

В геноме *В. leptomitoformis* D-402 имеется полный набор генов для компонентов электронтранспортной цепи (табл. П2, голубые полосы на пятой дорожке на рис. 22), что делает возможным дыхание этого штамма на разных энергетических субстратах, включая метанол и другие C<sub>1</sub>-соединения.

Предполагаемая общая схема метаболизма *Beggiatoa leptomitoformis* D-402<sup>т</sup> при литоавтотрофном микроаэробном и метилотрофном аэробном культивировании приведена на рисунке 29.



Рис. 29. Предполагаемая общая схема метаболизма *Beggiatoa leptomitoformis* D-402<sup>т</sup> при литоавтотрофном микроаэробном и метилотрофном аэробном росте.

# Глава 6. Azospirillum thiophilum $BV-S^T$

В состав рода *Azospirillum* входит 17 видов бактерий, но только для одного из них – *A. thiophilum* BV-S<sup>T</sup> – была показана способность к литотрофному росту в присутствии восстановленных соединений серы (Lavrinenko et al., 2010; Фролов и др., 2013).

Геном *A. thiophilum* был секвенирован и помещен в GenBank почти одновременно нашей (Fomenkov et al., 2016) и еще одной исследовательской группой (NZ\_LAEL00000000 .1) (Kwak and Shin 2016). В работе Kwak и Shin было показано наличие генов нитрогеназного и Sox-комплекса, что согласуется с ранее полученными данными по фиксации молекулярного азота и механизму окисления тиосульфата (Lavrinenko et al., 2010; Фролов и др., 2013). Они также идентифицировали гены, кодирующие рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазу и фосфорибулокиназу. Однако способность этого организма к автотрофному росту и к диссимиляционному серному метаболизму не была подтверждена экспериментально (Kwak and Shin 2016).

## 6.1. Характеристика генома

Геном A. thiophilum состоит из восьми замкнутых хромосом (рис. 29) (NZ\_CP012401.1-NZ\_CP012408.1) с общей длиной 7,6 млн.п.о и средним содержанием G + C 68,2%. Семь замкнутых циклических генетических элементов имеют одинаковое покрытие около 370, что указывает на то, что они представлены одинаковым числом копий и, вероятно, реплицируются с примерно равной скоростью, за исключением хромосомы 7, которая имеет двойной охват 660 (Fomenkov et al., 2016). Было предсказано в общей сложности 6393 белок-кодирующих последовательностей (CDS), 79 тРНК, 4 нкРНК и 26 рРНК. 4328 CDS имеют сходство с последовательностями известных генов и 2065 CDS с неизвестными функциями. Средняя длина гена составляет приблизительно 1010 п.о., а плотность кодирования составляет 0,84 гена на т.п.о.

Организация генов основных метаболичческих путей, обсуждаемых в данной работе, приведена на рисунке 30.



Рис. 29. Круговые карты хромосом A. thiophilum  $BV-S^T$ .

106

Организация генов Sox-комплекса

Хромосома 5 soxC soxD so<sup>st</sup>so<sup>st</sup>soxA soxX soxB

Организация генов цикла Кальвина



Хромосома 3 tsdA trB ttrC ttrA~ 7 т.п.о.

Рис. 30. Организация генов основных метаболических путей, обсуждаемых в данной работе, у *Azospirillum thiophilum* BV-S<sup>T</sup>. Названия генов приведены в таблице ПЗ.

#### 6.2. Литотрофный рост в присутствии тиосульфата

Анализ генома *A. thiophilum* выявил наличие кластера генов *soxABCDXYZ*, что позволяет предположить возможность окисления тиосульфата мультиферментным Sox-комплексом (Fomenkov et al., 2016; Kwak and Shin, 2016).

Несмотря на то, что ранее было предсказано наличие гена tsdA, кодирующего тиосульфатдегидрогеназу (TsdA), он не был аннотирован в геноме *A. thiophilum* BV-S<sup>T</sup>. Однако в базе данных NCBI был найден белок, принадлежащий к семейству цитохромов, который кодирует ген, гомологичный tsdA (*cyt c*) на третьей хромосоме. Выравнивание этих последовательностей с последовательностями гомологичных белков из *Gammaproteobacteria* позволило выявить консервативные мотивы, аналогичные тем, что показаны для ранее описанных TsdA (рис. 31).

cam 71 ETKMPKNSEY SKMVILGNKI LNETSKYVGP OAKDPKKRFA GNNLSCSSCH AN----GGSV All 76 AAALLPDGAL GESIVRGRRY LSDTPAQL-- ----PDFV GNGLACRHCH PGRDGEVGTE AZO 95 PADRLPEGPF GEAVARGREI FTNTPTNA-- -----GQFV GNGLSCSNCH LD---AGRH Beg 76 YIEDIPDDKY GDLVKMGRNI FVNTQKYG-- -----KRYV GNGLNCTNCH LS----EGRK Pse 74 QEKDLPANAY GELVKQGRAI FVDTQKYA-- ----AEYV GNGMNCTNCH IE----QGRK Thi 74 DESEIPNNEY GETVRQGKAL FTNTQQYA-- -----KKYV GNAMNCSNCH L------Cam 131 QNQSGFVGIW ARFPQYNARG DKVITLAIRI NGCFERSMNG -----KRMP SDTPEMKAML All 136 ANAAPFVGVV GRFPQYSARH GRLITLEGRI GDCFERSLNG -----RALA LDHPALIDML AZO 155 PYSAPMWAAW TSYPMYRSKN KQINTMEIRV MGC TYSMNA QHSVSGGPPP HGHDIYRDLE Beg 136 ANAAPLWGAY GMYPQYRGKN REVVTFQERI QDCFKYSLDG -----IAPT VDSPEMEALI Pse 134 ANSAPLWGAY PMYPAYRKKN DKVNSYAERM QGCFQFSMNG -----TPPA ADSHVINALT Thi 134 ----LWAAY VLYPAYRKKT GTVDTIQSRI QGCFMYSMDG -----RPPA LDSKEMTALV Cam 191 TYMQWLSQGV PVGAKIEGQG LKKIDFISRA ADPKKGKAIY MDKCAVCHQE NGLGLKNEDS All 196 AYMSWLSQGV PVGAVVAGHG IPTLTLE-RE PDGVHGEALY QARCLACHGA DGSGTLDAD-Azo 215 AYFFWLATGA PTNGKMQGGG FGKVEKADGG YDPGRGAAVF AENCAVCHGA DGQGRTDIN-Beg 196 AYAHWLSKGV PVGVLLPGNG FTPVNRT-RA PSTENGEILY KTQCAMCHGK DGLGYKYEDD Pse 194 AYSYWLSSGA PTGQELPGRA YPEVPQPQGG FDIAKGRQIY AEQCAVCHGD DGQGQKAGD-Thi 194 TYHYWMSKGA PTGVKLPGQG FIKVPKPPQT PDLARGEAVY KANCVICHGA NGEGIKVDG-Cam 251 AGAYYLYPPL WGDDSYNTGA GMYRLIKAAS YIKENMPQGA PD-LSLEDAY DVAAYMNSQA All 256 -G-RYLFPPL WGPRSFNTGA GMNRQATAAG FIKHKMPLGA DDSLSDEEAW DVAGFVLTHP AII 250 -G-RILFPPL WGFRSFNIGA GMARIDTAAA FIKHNMPLSQ PGRLSDRAW DVAAFIDSQE Azo 275 -G-RIVFPPL WGPDSYNWGA GMARIDTAAA FIKHNMPLSQ PGRLSDREAW DVAAFIDSQE Beg 256 RP-GYMFPPL WGSDSFNRAA GMNKVKTAAQ FIKANMPLGR GFTLTDNEAV DIAYYMWIQS Pse 254 ---TYVFPPL WGRDSFNWGA GMHRINTAAA FIKESMPLGK GGTLGDDEAW HVAAYMNSHE Thi 254 ---QHAFPPL WGKESFNWGA GMHRIDTAAG FIKANMPYGL GGTLSDQEAW DVALFMNSHE

Рис. 31. Множественное выравнивание последовательностей TsdA из штаммов *Campylobacter jejuni* (Cam) и *Allochromatium vinosum* (All) с гомологичными аминокислотными последовательностями из *Beggiatoa* sp. PS (EDN69405.1) (Beg), *Pseudomonas* sp. BAY1663 (EXF46491.1) (Pse), *Thiobacillus denitrificans* (WP\_011310641.1) (Thi) и *Azospirillum thiophilum* (Azo). Консервативные аминокислоты, специфичные для TsdA, выделены в рамочки.
В микроаэробных условиях при литогетеро- или литоавтотрофном росте A. *thiophilum* способен к диссимиляционному окислению тиосульфата, что приводит к образованию сульфата и тетратионата. Сульфат образуется за счет SOX-системы, тогда как активность TsdA приводит к синтезу тетратионата (рис. 32). Активность соответствующих ферментативных систем, а также скорость экспрессии гена *soxB* была измерена ранее (Фролов и др., 2013). В отличие от представителей семейства *Beggiatoaceae* у *A. thiophilum* выявлены гены *soxCD*, кодирующие ферменты прямого Sox-пути. Другой исследовательской группе удалось экспрессировать ген *tsdA* в клетках штамма *E. coli* BL21 (DE3), в результате чего был получен рекомбинантный белок тиосульфатдегидрогеназы (Orlova et al., 2017).

Было также установлено, что молярное количество окисленного тиосульфата при литоавтотрофном микроаэробном росте *A. thiophilum* увеличивалось в 5-6 раз по сравнению с миксотрофным ростом, что указывает на возрастающую роль тиосульфата в энергетическом метаболизме в качестве донора электронов в микроаэробных услових.





Гены, кодирующие ферменты, участвующие в диссимиляционном окислении сульфида до элементной серы (*soxF*), серы до сульфита (*dsrABEFHCMLJOPNR*) и сульфита до сульфата (*sopT, sat, apr, sor* и *soe*), не были обнаружены.

Предполагаемая общая схема серного метаболизма у *A. thiophilum* BV-S приведена на рисунке 33.



Рис. 33. Предполагаемае общая схема серного метаболизма у *A. thiophilum* BV-S<sup>T</sup>

## 6.3. Литотрофный рост в присутствии молекулярного водорода

Было обнаружено, что A. thiophilum содержит гены hyaAB, которые кодируют большие и малые каталитические субъединицы мембран-связанной [NiFe] -гидрогеназы группы I (Volbeda et al., 1995; Vignalis et al., 2001). Эта группа экстрацитоплазматических ферментов осуществляет реакцию окисления водорода и генерацию протон-движущей силы (Vignais et al., 2001). В анализируемом геноме также был обнаружен ген hyaCb, который кодирует субъединицу цитохрома b, которая вместе с гидрофобным C-концевым фрагментом малой субъединицы присоединяет гидрогеназу к цитоплазматической мембране (Vignais et al., 2001; Vignais 2008). Помимо каталитических субъединиц, геном A. thiophilum содержит гены hypABCDE. Они

кодируют белки, участвующие в созревании [NiFe] -гидрогеназ (Wolf et al., 1998) (табл. ПЗ).

Для подтверждения способности *A. thiophilum* к росту на водороде были проведены эксперименты по определению активности гидрогеназы. Активность гидрогеназы в *A. thiophilum* составила  $11,8 \pm 0,6$  мкмоль мин<sup>-1</sup> мг<sup>-1</sup> белка. Литотрофный рост *A. thiophilum* в присутствии H<sub>2</sub> происходил только в автотрофных микроаэробных условиях. При этом потребление H<sub>2</sub> составляло до 20% от внесенного H<sub>2</sub> (50% газовой фазы).

#### 6.4. Автотрофный рост

Ранее было показано. что *A*. thiophilum способен к хемоорганогетеротрофному и хемолитогеротрофному росту (Фролов и др., 2013). Его способность к автотрофному росту оставалась под вопросом. Хотя Shin (2016)обнаружили Kwak гены, кодирующие рибулозо-1,5-И бисфосфаткарбоксилазу и фосфорибулокиназу в геноме А. thiophilum, автотрофный рост для этого организма ранее не был показан.

Анализ полногеномной последовательности, полученной в нашей лаборатории, показал, что он содержит полный набор генов, кодирующих цикл Кальвина-Бенсона-Бассама (рис. 30, табл. ПЗ). Ген, кодирующий седогептулозу-1,7-бифосфатазу, не обнаружен в геноме *А. thiophilum*. Однако у бактерий его функция может выполняться фруктозо-1,6-бифосфатазой с двойной специфичность к сахарам (Tamoi et al., 1996). Также отсутствует ген трансальдолазы, катализирующей превращение трех- и семиуглеродного фосфосахара в четырех- и шестиуглеродный. Однако имеется ген транскетолазы, катализирующей превращение соединений в две пентозы.

Гены, кодирующие ферменты цикла Кальвина-Бенсона-Бассама (*pgk, fba, gapA, tktA, rpiA, rpe, tpiA, cbbR, rbcL, rbcS, cbbX, fbp, prkB* и *fbaA*), не образуют в геноме единого кластера, а распределены по трем хромосомам (1, 2 и 5). Большинство из этих генов расположены в первой и второй хромосомах и представлены одной копией. Первым исключением является NADPH / NADP-зависимая глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, представленная двумя

копиями гена *gapA* в первой и пятой хромосомах. Второе исключение - транскетолаза с тремя копиями гена *tktA*, расположенного в первой, второй и пятой хромосомах (рис. 30).

Чтобы экспериментально подтвердить работу цикла Кальвина-Бенсона-Бассама, мы измерили активность нескольких ферментов, участвующих в ассимиляции СО<sub>2</sub> и его восстановлении при автотрофном росте.

В клетках *А. thiophilum*, выращенной в автотрофных условиях, выявлена активность одного из ключевых ферментов цикла Кальвина-Бенсона-Бассама, фосфорибулокиназы. Она составила 2,50  $\pm$  0,13 мкмоль мин<sup>-1</sup> мг<sup>-1</sup> белка. При литогетеротрофном росте активность этого фермента не была обнаружена. Активность карбоангидразы, фермента, участвующего в превращении бикарбонатных ионов в CO<sub>2</sub>, который непосредственно взаимодействует с РБФК, при литоавтотрофном и литогеротрофном росте составляла 19,60  $\pm$  1,00 и 3,30  $\pm$  0,17 условных единиц Вилбурга и Андерсена, соответственно (табл. 18).

Таблица 18. Активность фосфорибулокиназы и карбоангидразы у *A*. *thiophilum* при литоавто- и литогетеротрофном культивировании

Условия	Активность фермента		
культивирования	Фосфорибулокиназа,	Карбоангидраза,	
	мкмоль мин <sup>-1</sup> мг <sup>-1</sup> белка	y.e. · мин <sup>-1</sup> ·мг белка <sup>-1</sup>	
Литоавтотрофный рост	$2,50 \pm 0,13$	$19,\!60 \pm 1,\!00$	
Литогетеротрофный рост	_	$3,30 \pm 0,17$	

Для подтверждения работы цикла Кальвина-Бенсона-Бассама в *A. thiophilum* была определена экспрессия гена *rbcL*, кодирующего большую субъединицу РБФК, для культуры, растущей в авто- и гетеротрофных условиях. Количественный ПЦР-анализ продемонстрировал, что уровень *rbcL*-мРНК в автотрофных условиях примерно в 8 раз выше, чем в гетеротрофных условиях (рис. 34).



Рис. 34. Уровень экспрессии гена *rbcL* при автотрофном и гетеротрофном росте в *Azospirillum thiophilum*. \* p < 0.05.

В геноме *A. thiophilum* также содержится ген, кодирующий РБФК, относящуюся к типу IV. Это белок, структурно подобный РБФК, но не способный катализировать риболозо-1,5-бисфосфатзависимую фиксацию  $CO_2$  (Hanson and Tabita 2003).

Таким образом, фиксация CO<sub>2</sub> *A. thiophillum* при автотрофном росте осуществляется через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама.

### 6.5. Метаболизм С<sub>1</sub>-соединений

В геноме *A. thiophilum* не было обнаружено генов метанмонооксигеназ и не был зарегистрирован рост в присутствии метана.

## 6.5.1. Окисление метанола

В геноме *A. thiophilum* закодированы гены ферментов, участвующих в окислении метанола до формальдегида. Они расположены во второй и пятой хромосоме (табл. П1, рис. 30).

В настоящее время известны три типа метанолдегидрогеназ (МДГ). МДГ первого типа представляют собой ферменты, состоящие из субъединиц разных типов: каталитических (гены *mxaFI*), акцепторов электронов цитохрома с (ген *mxaG*), субъединиц, необходимых для переноса ионов кальция в активный центр (гены *mxaACKL*) и субъединиц с неизвестной функцией (гены *mxaRS*). Второй

тип метанолдегидрогеназ (MDH2) встречается у представителей порядков *Burchorderiales* и *Rhodocyclales*. Этот фермент состоит из одного типа субъединиц. Недавно описанный третий тип метанолдегидрогеназ (белок XoxF) пока еще недостаточно охарактеризован (Chistoserdova, 2011).

В thiophilum обнаружены геноме Α. гены всех трех типов метанолдегидрогеназ. Для подтверждения их функциональной роли было проведено выравнивание их аминокислотных последовательностей с белками типичных метилотрофов. МхаF-метанолдегидрогеназа первого типа демонстрирует 77,6 % идентичности с гомологичным белком Methylobacterium extorquens DM4 (CAX26759.1). Mdh2-метанолдегидрогеназа второго типа на 90% идентична аналогичной последовательности в геноме Methyloversatilis universalis FAM5 *Rhodocyclales* (WP 026188192.1). порядка А метанолдегидрогеназа XoxF третьего типа на 64,3 % идентична с гомологичным белком *M. extorquens* DM4 (CAX24146.1).

Геном A. thiophilum содержит гены кластера mxa, кодирующего классическую МДГ. Было проведено выравнивание аминокислотных последовательностей белков A. thiophilum, кодируемых этими генами, с аминокислотными последовательностями первой бактерии, для которой была описана ΜДΓ первого типа -М. extorquens. Идентичность между последовательностями MxaI, MxaA, MxaC, MxaD, MxaK, MxaL, MxaJ, MxaG, MxaS, MxaR и MxaB A. thiophilum и M. extorquens варьировала от 41,3 до 68,8% (табл. 19). Вместе они сформировали канонический тип кластера mxa (Lidstrom et al., 1994; Anthony, 2004; Lidstrom et al., 2006).

БелокНомер последовательности M. extorquens в ГенБанкИдентичность (%)MxalCAX26756.164.6MxaACAX26753.145.8MxaCCAX26752.149.6MxaDCAX26749.147.3MxaKCAX26751.141.3MxaLCAX26750.152.0MxaJCAX26758.150.2MxaGCAX26757.150.0MxaSCAX26754.145.0MxaRCAX26755.168.8MxaBCAX26746.140.9		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
MxaI         CAX26756.1         64.6           MxaA         CAX26753.1         45.8           MxaC         CAX26752.1         49.6           MxaD         CAX26749.1         47.3           MxaK         CAX26751.1         41.3           MxaL         CAX26750.1         52.0           MxaJ         CAX26758.1         50.2           MxaG         CAX26757.1         45.0           MxaS         CAX26754.1         45.0           MxaB         CAX26756.1         68.8	Белок	Номер последовательности <i>M. extorquens</i> в ГенБанк	Идентичность (%)
MxaA         CAX26753.1         45.8           MxaC         CAX26752.1         49.6           MxaD         CAX26749.1         47.3           MxaK         CAX26751.1         41.3           MxaL         CAX26750.1         52.0           MxaG         CAX26758.1         50.2           MxaG         CAX26757.1         50.0           MxaS         CAX26754.1         45.0           MxaB         CAX26755.1         68.8	MxaI	CAX26756.1	64.6
MxaC         CAX26752.1         49.6           MxaD         CAX26749.1         47.3           MxaK         CAX26751.1         41.3           MxaL         CAX26750.1         52.0           MxaJ         CAX26758.1         50.2           MxaG         CAX26757.1         50.0           MxaS         CAX26754.1         45.0           MxaR         CAX26756.1         68.8           MxaB         CAX26756.1         40.9	MxaA	CAX26753.1	45.8
MxaD         CAX26749.1         47.3           MxaK         CAX26751.1         41.3           MxaL         CAX26750.1         52.0           MxaJ         CAX26758.1         50.2           MxaG         CAX26757.1         50.0           MxaS         CAX26754.1         45.0           MxaR         CAX26755.1         68.8           MxaB         CAX26746.1         40.9	MxaC	CAX26752.1	49.6
MxaK         CAX26751.1         41.3           MxaL         CAX26750.1         52.0           MxaJ         CAX26758.1         50.2           MxaG         CAX26757.1         50.0           MxaS         CAX26754.1         45.0           MxaR         CAX26755.1         68.8           MxaB         CAX26746.1         40.9	MxaD	CAX26749.1	47.3
MxaL         CAX26750.1         52.0           MxaJ         CAX26758.1         50.2           MxaG         CAX26757.1         50.0           MxaS         CAX26754.1         45.0           MxaR         CAX26755.1         68.8           MxaB         CAX26746.1         40.9	MxaK	CAX26751.1	41.3
MxaJ         CAX26758.1         50.2           MxaG         CAX26757.1         50.0           MxaS         CAX26754.1         45.0           MxaR         CAX26755.1         68.8           MxaB         CAX26746.1         40.9	MxaL	CAX26750.1	52.0
MxaG         CAX26757.1         50.0           MxaS         CAX26754.1         45.0           MxaR         CAX26755.1         68.8           MxaB         CAX26746.1         40.9	MxaJ	CAX26758.1	50.2
MxaS         CAX26754.1         45.0           MxaR         CAX26755.1         68.8           MxaB         CAX26746.1         40.9	MxaG	CAX26757.1	50.0
MxaR         CAX26755.1         68.8           MxaB         CAX26746.1         40.9	MxaS	CAX26754.1	45.0
MxaB CAX26746.1 40.9	MxaR	CAX26755.1	68.8
	MxaB	CAX26746.1	40.9

Таблица 19. Идентичность между белками Мха-кластера A. thiophilum BV-S<sup>T</sup> и Methylobacterium extorquens

## 6.5.2. Окисление формальдегида

Окисление формальдегида до формиата происходит в *A. thophilum* через тетрагидрометаноптериновый путь (ТГМП-путь). В геноме были обнаружены гены, кодирующие все ферменты этого пути (табл. ПЗ, рис. 30). Они расположены в пятой хромосоме.

Формилметанфурандегидрогеназы С, А, В и N-формилтрансферазы (D) представлены комплексом формилметанфурантрансферазы / гидролазы (FTR / гидролазным комплексом), кодируемым генами *fhcCDAB*.

## 6.5.3. Окисление формиата

Окисление формиата является конечной стадией цепи реакций прямого окисления в аэробных метилотрофных бактериях. Анализ генома *A. thiophilum* показал, что формиатдегидрогеназа этого организма является NAD-молибденсодержащим ферментом. Она кодируется генами *fdsABGD*. В геноме дополнительно содержится по три копии генов альфа (*fdhA*) и дельта-субъединиц (*fdhD*) (табл. ПЗ).

Для подтверждения геномных данных было проведено культивирование *A. thiophilum* BV-S на питательной среде, включающей в качестве единственных источников углерода и энергии метанол или формиат. Для проверки влияния разных концентраций кислорода на метилотрофный рост бактерии создавали аэробные, микроаэробные и анаэробные условия. Выполнено 4 пассажа бактерий с гетеротрофной среды, причем клетки подсчитывались как после первого пассажа (0 точка), так и через трое суток.

Полученные графики демонстрируют высокие значения прироста бактерий в первом пассаже независимо от создаваемых условий (рис. 35, 36, 37). Это объясняется наличием в метилотрофной среде остаточного содержания пептона и сукцината из гетеротрофной среды. С увеличением количества пассажей прирост биомассы уменьшался, стабилизируясь к четвертому пассажу. Увеличение биомассы наблюдалось как на среде с метанолом, так и с формиатом, без явных различий. Увеличение биомассы составило 16-31 · 10<sup>6</sup> кл/мл. В итоге был продемонстрирован метилотрофный рост *A. thiophilum* BV-S при наличии формиата или метанола в среде для культивирования.

Также в ходе экспериментов с культивированием было выявлено влияние концентрации кислорода на прирост биомассы бактерий. Показано, что в среде без кислорода с тетратионатом в качестве терминального акцептора (рис. 37) прирост клеток вырос в 3,3 раза, в то время как в аэробных и микроаэробных условиях (рис. 35, 36) увеличение количества клеток было практически одинаковым (в 4,5 раза).

Согласно биоинформатическим данным, ассимиляция углерода у A. *thiophilum* BV-S происходит только на уровне CO<sub>2</sub> в цикле Кальвина-Бенсона-Бассама. В геноме *A. thiophilum* не были выявлены гены некоторых ферментов серинового цикла (*AGXT, hprA, mtkAB*), а также гены ключевых ферментов рибулозомонофосфатного (*hxlAB*) цикла. Таким образом, эти циклы, повидимому, не могут обеспечивать ассимиляцию формальдегида у *A. thiophilum*.

Предполагается, что внесение экзогенного CO<sub>2</sub> в среду вызовет увеличение прироста в несколько раз за счет усиления функционирования цикла Кальвина-Бенсона-Бассама. В ходе экспериментов было подтверждено это предположение. Так, дополнительное введение к метилотрофной среде гидрокарбоната натрия (0,1 г/л) вызвало увеличение биомассы бактерий в 7 раз (рис. 38). Сравнение значений 0 точки и 3 суток при аэробном культивировании на метаноле без соды и с содой показало повышение прироста клеток в 1,5-1,8 раза.

116



Рис. 35. Прирост клеток на метаноле в аэробных условиях



Рис. 37. Прирост клеток на метаноле в анаэробных условиях



Рис. 36. Прирост клеток на метаноле в микроаэробных условиях



Рис. 38. Прирост клеток на метаноле в аэробных условиях без соды и с содой

117

Культивирование с метанолом в аэробных условиях показало стабильный рост культуры в течение нескольких пассажей. Прибавка белка составила около 69 мг белка л<sup>-1</sup>. Для изучения влияния металлов лантаноидного ряда на рост бактерий к среде культивирования добавляли хлорид лантана (III), что приводило к приросту биомассы в 1,6 раза (рис. 39). Из полученных данных следует, что хлорид лантана, стимулируя экспрессию некоторых типов МДГ, способствует повышенному образованию продуктов МДГ, что приводит к росту интенсивности всего энергетического метаболизма.



Рис. 39. Динамика прироста белка у *А. thiophilum* BV-S при метилотрофном росте с лантаноидами и без.

Исходя из того, что ощутимой разницы в приросте бактерий на метаноле в аэробных и микроаэробных условиях обнаружено не было, то дальнейшие эксперименты проводились с культурой, выращенной в аэробных условиях.

Ранее было установлено, что металлы лантаноидного ряда способны регулировать экспрессию, а, следовательно, изменять активность всех типов МДГ (Huff, 2017, Krause et al., 2016, Vu et al., 2016, Wehrmann et al., 2017). Для того, чтобы экспериментально доказать функционирование МДГ, была измерена суммарная активность МДГ в культуре, выращенной на метаноле без лантаноидов и с присутствием хлорида лантана. В культуре, выращенной на формиате, была определена активность NAD-зависимой ФДГ.

В результате у *А. thiophilum* BV-S была обнаружена общая активность разных типов МДГ и ФДГ, составившая 17,50± 1,25 и 2,30±0,03 мкмоль · мин<sup>-1</sup> ·

мг белка<sup>-1</sup>, соответственно. Хлорид лантана вызвал увеличение активности дегидрогеназ. Так, суммарная активность МДГ выросла в 3 раза, активность ФДГ увеличилась в 2 раза (табл. 20). Активность ФДГ при культивировании на формиате оказалась в 2,7 раза выше по сравнению с активностью ФДГ на метаноле. Увеличение концентрации формиата в среде вызвало увеличение активности ФДГ.

Таблица 20. Активность ферментов ФДГ и МДГ у *A. thiophilum* BV-S в отсутствии и присутствии хлорида лантана

Фермент	Активность фермента, мкмоль · мин <sup>-1</sup> мг белка <sup>-1</sup>		
	Формиат	— LaCl <sub>3</sub>	$+ LaCl_3$
Метанолдегидрогеназа		17,50±1,25	54,00±1,75
(суммарная активность)			
Формиатдегидрогеназа	6,30±0,03	2,30±0,03	4,70±0,03

Для проверки функционирования разных типов метанолдегидрогеназ было проведено сравнение экспрессии генов *mxa*, *mdh2*, *xoxF* в гетеротрофных, метилотрофных условиях, в метилотрофных условиях с хлоридом лантана. Было показано увеличение экпрессии *mxa* в метилотрофных условиях в 18,6 раза по сравнению с гетеротрофными, *mdh2* — в 15,7 раза, *xoxF* — в 2,8 раза. Наличие лантаноидов в среде культивирования стимулировало экспрессию *mdh2* в 2 раза, *xoxF* — в 7,3 раза. Экспрессия же *mxa* в присутствии La (III) снижалась в 2,5 раза. Таким образом, показано, что утилизация метанола в метилотрофных условиях обеспечивается в основном за счет работы МДГ 1 и 2 типа. Добавление La (III) включает в работу МДГ 3 типа, но ингибирует МДГ 1 типа (рис. 40).



Рис. 40. Уровень экспрессии генов метанолдегидрогеназ у *A. thiophilum* при органогетеротрофном, метилотрофном и метилотрофном в присутствии La (III) росте. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.

Таким образом, анализ генома показал, что *A. thiophilum* использует метанол и формиат в качестве доноров электронов. CO<sub>2</sub>, образовавшийся во время этого процесса, может быть далее использован через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама.

#### 6.6. Центральный метаболизм

*А. thiophilum* использует дыхательный тип метаболизма. Он не способен к фототрофному росту и не может сбраживать углеводы. Соответственно в его геноме был выявлен полный набор генов, кодирующих ферменты гликолиза, ЦТК и глиоксилатного цикла (табл. ПЗ). Образующийся в ходе гликолиза пируват далее окисляется до ацетил-КоА посредством пируватдегидрогеназного комплекса. У *А. thiophilum* этот комплекс состоит из пяти типов субъединиц, кодируемых генами *pdhABC*, *dld* и *aceE* (табл. ПЗ).

Для подтверждения функционирования ЦТК и глиоксилатного цикла у *A*. *thiophilum* была определена активность большинства функционирующих в них ферментов (табл. 21).

120

	МИН	мі ослка	
Малатдегидрогеназа	$0,\!67\pm0,\!03$	Сукцинатдегидрогеназа	$0{,}58\pm0{,}03$
(NAD)			
Цитратсинтаза	$0,\!10\pm0,\!01$	Фумаратгидратаза	$3,00 \pm 0,15$
Аконитатгидратаза	$0,39 \pm 0,02$	Изоцитратдегидрогеназа	$1,\!10 \pm 0,\!05$
		(NADP)	
Изоцитратлиаза	$0,\!11 \pm 0,\!01$	Малатсинтаза	$0,\!12\pm0,\!01$

Таблица 21. Активность ферментов ЦТК и глиоксилатного цикла, мкмоль · мин<sup>-1</sup> · мг белка<sup>-1</sup>

Также в геноме *A. thiophilum* были обнаружены гены *ppc* и *pckA*, кодирующие фосфат-зависимую ФЕП-карбоксилазу и ГТФ-зависимую ФЕП-карбоксикиназу, следовательно, данный организм способен к декарбоксилированию оксалоацетата к фосфоенолпирувата. Также в геноме было обнаружено две копии гена *maeB*, кодирующего NADP -зависимый малик-энзим, который может образовывать пируват посредством декарбоксилирования малата. Ген *maeA*, кодирующий NAD-зависимый малик-энзим, не был обнаружен.

Анализируемый геном также содержал гены, кодирующие аспартатаминотрансферазу (*aspC*, 2 копии), катализирующую превращение аспартата и 2-оксоглутарата в оксалоацетат и глутамат, и *gdh*, кодирующий глутаматдегидрогеназу, которая участвует в восстановительном аминировании 2-оксоглутарата в глутамат. Таким образом, выход из ЦТК на конструктивный метаболизм может также происходить через 2-оксоглутарат.

Поэтому некоторые промежуточные продукты ЦТК (оксалоацетат, малат и 2-оксоглутарат) могут быть вовлечены в анаболические процессы, приводящие к образованию фосфоенолпирувата, пирувата и аминокислот соответственно.

### 6.7. Дыхательная цепь

В геноме *A. thiophilum* закодированы все основные компоненты электронтранспортной цепи.

Комплекс I, NADH: хинон-оксидоредуктаза, кодируется генами, образующими два кластера: *nuoABCEFGHJKLMN* и *nuoDI*.

Комплекс II, сукцинатдегидрогеназа, кодируется опероном из четырех генов: гена *sdhC*, кодирующего субъединицу цитохрома *b556*, гена *sdhB*,

кодирующего железосерный белок, гена *sdhA*, кодирующего субъединицу флавопротеина, и гена *sdhD*, кодирующего гидрофобный мембранный якорный белок.

Комплекс III, убихинон-цитохром *с*-оксидоредуктаза, состоит из железосерной субъединицы (кодируемой геном *rpi1*), субъединицы цитохрома *b* (кодируемой геном *cytB*) и субъединицы цитохрома  $c_1$  (кодируемой геном *cyc1*). Все эти гены расположены в одном опероне.

Комплекс IV представлен пятью типами оксидаз: 4 субъединицы типа cbb3 (кодируемые ccoNOPG), 3 сох-субъединицы (кодированные cox123), 3 субъединицы цитохром d убихинолоксидазы (кодируются cydABCD), 2 субъединицы цитохром bd (закодированны генпми qxtI и qxtII) и 4 субъединицы цитохром bd (закодированны генпми qxtI и qxtII) и 4 субъединицы цитохром o убихинолоксидазы (кодируется cyoABCD).

Синтез АТФ из АДФ осуществляется при помощи АТФ-синтазы F-типа, которая кодируется опероном *atpABCDEGH* и отдельно расположенным геном субъединицы b АТФазы H<sup>+</sup> -транспортирующего типа, *atpF*.

Фосфаты, необходимые для функционирования АТФазы, поставляются неорганической пирофосфатазой, кодируемой геном *ppa* и полифосфат киназой, кодируемой *ppk. ppk* расположен рядом с другими генами АТФазы, а гена *ppa* лежит вне этого кластера.

## 6.8. Терминальные оксидоредуктазы анаэробного дыхательного пути

*А. thiophilum* был способен к анаэробному дыханию на тетратионате (Richard, 1977; Barrett and Clark, 1987). При анализе генома был выявлен оперон, *ttrABC*, кодирующий A, B и C-субъединицы тетратионатредуктазы соответственно.

Интересно, что ген, кодирующий тиосульфатдегидрогеназу, ответственную за литотрофный рост в присутствии тиосульфата и его окисление до тетратионата, расположен недалеко от генов тетратионатредуктазы (расстояние ~ 7 т.п.о, рис. 30).

Наблюдалось увеличение биомассы клеток при гетеротрофном анаэробном культивировании *A. thiophilum* с тетратионатом. Бактериальный рост

сопровождался эквимолярным восстановлением тетратионата до тиосульфата в соответствии с уравнением:  $S_4O_6^{2-} + 2\bar{e} = 2 S_2O_3^{2-}$  (рис. 41).



Рис. 41. Динамика восстановления тетратионата при анаэробном росте *A*. *thiophilum*  $BV-S^{T}$ 

В геноме закодированы гены еще одной терминальной дыхательной редуктазы – NO-редуктазы (Martinez-Espinosa et al., 2007). Они входят в состав одного кластера *norCBQDE* (табл. ПЗ). Однако физиологическая роль предсказанной NO-редуктазы *у А. thiophilum* не подтверждена, и до сих пор нет информации о способности *А. thiophilum* восстанавливать нитраты до NO.

### 6.9. Азотфиксация

Способность A. thiophilum фиксировать молекулярный азот была продемонстрирована экспериментально (Lavrinenko et al., 2010). Квак и Шин продемонстрировали наличие всех генов, необходимых для фиксации азота (Kwak and Shin 2015). Все эти гены расположены в первой хромосоме и образуют шесть кластеров, что согласуется с нашими данными (табл. ПЗ).

Общая схема метаболизма Azospirillum thiophilum  $BV-S^T$  приведена на рисунке 42.



Рис. 42. Центральный метаболизм Azospirillum thiophilum BV-S<sup>T</sup>

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе наших исследований был существенно расширен состав семейства *Beggiatoaceae* - описаны и узаконены как новые таксоны 2 вида и 1 род: *Thioflexithrix psekupsensis* gen. nov., sp. nov. и *Beggiatoa leptomitoformis* sp. nov. Уровень идентичности гена 16S pPHK *Thioflexithrix psekupsensis* с ближайшими филогенетическими соседями составляет только 86%, что является пороговым значением для выделения нового семейства. Однако в настоящее время к семейству *Beggiatoaceae* относят большое количество родов со статусом *Candidatus*, среди которых уровень идентичности генов 16S pPHK колеблется в пределах 89-91%. Эти значения также позволяют описать каждый род как отдельное семейство. Однако на данный момент отсутствие чистых культур и малое количество экспериментальных данных не дает возможности провести полную реклассификацию семейства *Beggiatoaceae*.

Согласно выше сказанному мы также не считаем своевременным классифицировать *Thioflexithrix psekupsensis* как представителя нового семейства. Это задача на будущее, когда будет получено больше данных по другим бесцветным сероокисляющим бактериям из семейства *Beggiatoaceae*.

Для бесцветных серобактерий характерно развитие в специфических экологических нишах – в микрозоне градиента H<sub>2</sub>S/O<sub>2</sub>. В этих местообитаниях создаются микроаэробные условия, которые обуславливают особенности углеродного, азотного и серного метаболизма бактерий. Обитая в неравновесных условиях, бесцветные серобактерии постоянно находятся в состоянии стресса: их рост лимитируется концентрацией кислорода, наличием различных питательных веществ, а чаще они испытывают воздействие нескольких факторов. Поэтому для выживания в быстро меняющихся условиях среды бактерии должны обладать широким метаболическим потенциалом.

В ходе нашей работы были получены полногеномные последовательности трех штаммов бесцветных серобактерий, анализ которых позволяет выявить их метаболический потенциал и сделать вывод о возможности

их адаптации к меняющимся условиям среды. Гены метаболических путей, обсуждаемых в данной работе, просуммированы на рисунке 43.

В случае *В. leptomitoformis* и *А. thiophilum* кислородный режим определяет тип метаболизма данных бактерий. В аэробных условиях они способы к органогетеротрофному и литогетеротрофному росту в присутствии восстановленных соединений серы и молекулярного водорода, но только в микроаэробных условиях они способны осуществлять литоавтотрофный рост. *Т. psekupsensis* и вовсе не способен к аэробному росту, а является факультативно анаэробным микроаэрофилом. Этот штамм образует огромное количество экзополисахаридов, снижающих скорость диффузии кислорода в клетки. На синтез полисахаридов он направляет в 10 раз больше углерода, чем на синтез белка, что свидетельствует об огромной важности защиты от избытка кислорода для данного микроорганизма.

Как известно, диазотрофные прокариоты, какими являются исследуемые бактерии, в природе занимают экониши с микроаэробными условиями. Именно микроаэробные условия обеспечивают высокую активность нитрогеназного комплекса, который, как известно, участвует в ассимиляции N<sub>2</sub> и инактивируется при высоких концентрациях кислорода.

Представители семейства *Beggiatoaceae* и *A. thiophilum* в природе развиваются в сероводородных биотопах, часто доминируя в них. Анализ генома и экспериментальные данные позволили выявить пути диссимиляционного окисления серных соединений исследованных представителей семейства *Beggiatoaceae* и *A. thiophilum*. В геномах были выявлены гены, кодирующие ферменты, окисляющие сульфид до элементной серы: *soxF*, кодирующий флавоцитохром *c* у *T. psekupsensis* и *B. leptomitoformis*, и *sqr*, кодирующий сульфид-хинон редуктазу у всех исследуемых бактерий.

	T. psekupsensis D3	B. leptomitoformis D-402	A. thiophilum BV-S
Гены цикла Кальвина	rbcLS, pgk, gapA, fbp, tktA, rpiA, rpe, prkB, tpiA, <mark>cbbQ</mark>	rbcLS, pgk, gapA, fbp, tktA, rpiA, rpe, prkB, tpiA, cbbX	rbcLS, pgk, gapA, fbp, tktA, rpiA, rpe, prkB, tpiA, cbbX, cbbR
Особенности цикла Кальвина	РБФК IAq Отсутствие седогептулозо- 1,7-бисфосфотазы Отсутствие трансальдолазы	РБФК IС Отсутствие седогептулозо- 1,7-бисфосфотазы Отсутствие трансальдолазы	РБФК IC, IV Отсутствие седогептулозо- 1,7-бисфосфотазы Отсутствие трансальдолазы
Гены литотрофного роста на H <sub>2</sub>	Гены [NiFe]-гидрогеназ: <i>hyaABCb</i> Гены созревания гидрогеназ: <i>hypABCDE</i>	Гены [NiFe]-гидрогеназ: <i>hyaABCb</i> Гены созревания гидрогеназ: <i>hypABCDE</i>	Гены [NiFe]-гидрогеназ: <i>hyaABCb</i> Гены созревания гидрогеназ: <i>hypABCDE</i>
Гены литотрофного роста на восстановленных соединениях серы	soxAXBYZ dsrABEFHCMLJOPNR soxF sqr	soxAXBYZ dsr EFHCMKJ soxF sqr	soxAXBYZCD tsdA - - sqr
Гены метилотрофного роста	_	МДГ: mxaF, mdh2 ТГМП-путь: fae, mtdB, fhcABCD, mptG ФДГ: fdh2ABCD	МДГ: mxaF, mdh2, xoxF ТГМП-путь: fae, mtdB, fhcABCD, mptG ФДГ: fsdABDG, fdhAD
Гены анаэробного дыхания	ДМСО-редуктаза: <i>dmsABC</i> Фумаратредуктаза: <i>sdhABCD</i>	-	Тетратионатредуктаза: <i>ttrABC</i>

Рис. 43. Наличие генов метаболических путей, обсуждаемых в данной работе, в геномах *T. psekupsensis* D3, *B. leptomitoformis* D-402, *A. thiophilum* BV-S. Черным выделены гены, присутствующие во всех трех геномах, синим – только в двух, красным – только в одном. - , гены данных метаболических путей не выявлены.

Было показано, что у всех трех исследуемых бактерий окисление тиосульфата осуществляется за счет функционирования Sox-комплекса, а у *A*. *thiophilum* – еще и за счет тиосульфатдегидрогеназы.

Представители семейства *Beggiatoaceae* при культивировании на сульфиде или тиосульфате способны к внутриклеточному накоплению глобул элементной серы, которая исчезает после нескольких пассажей на среде без восстановленных серных соединений. Для *T. psekupsensis* удалось установить, что серные глобулы могут окисляться до сульфита под действием комплекса rDSR, полный набор генов которого был выявлен в геноме. В геноме *B. leptomitoformis* отсутствуют гены каталитических субъединиц комплекса, что характерно и для *B. alba* и некоторых других нитчатых серобактерий. У *A. thiophilum* не были выявлены гены rDSR комплекса. Поэтому механизм окисления серы до сульфита у этих серобактерий до сих пор остается загадкой. Также для всех трех штаммов непонятен путь окисления сульфита до сульфата.

Во всех трех анализируемых геномах были выявлены гены [NiFe]гидрогеназ *hyaABCb* и гены, кодирующие ферменты, принимающие участие в созревании гидрогеназ – *hypABCDE*. Детектированные гидрогеназы обеспечивают литотрофный рост в присутствии H<sub>2</sub>. Следует заметить, что литотрофия в присутствии H<sub>2</sub> для исследуемых бактерий была возможна только в микроаэробных условиях.

Все три исследованных штамма способны к литоавтотрофному росту только в микроаэробных условиях за счет функционирования цикла Кальвина-Бенсона-Бассама. Цикл у всех исследованных серобактерий имеет общие особенности: 1) во всех геномах отсутствует ген седогептулозо-1,7бисфосфатазы, и данная реакция катализируется фруктозо-1,6-бисфосфатазой с двойной специфичностью к сахарам; 2) у всех отсутствуют трансальдолазы, но функционируют транскетолазы, которые обеспечивают синтез пентоз в процессе регенерации акцептора - рибулозо-1,5-бисфосфата. Следует отметить, что РБФК у представителей семейства *Beggiatoaceae* и A. thiophilum относится к разным формам: у T. psekupsensis форма IAq, у B. leptomitoformis - форма IC, а у A. thiophilum два типа РБФК, IC и IV.

*A. thiophilum* и *B. leptomitoformis* способны к росту с использованием метанола в качестве единственного источника углерода и энергии. Способность утилизировать это токсичное соединение имеет для них большое значение, поскольку они были выделены из местообитаний, в которых может присутствовать метанол – нефтегазоносная область Северного Кавказа (А. загрязненный thiophilum) И источник, сточными водами деревообрабатывающего комбината (B. leptomitoformis). Окисление метанола при метилотрофном росте оба штамма осуществляют в три этапа. На первой стадии метанол окисляется до формальдегида при помощи метанолдегидрогеназ, кодируемых генами mxaF, xoxF и mdh2 у A. thiophilum и xoxF и mdh2 у B. leptomitoformis, далее формальдегид окисляется ДО формиата через тетрагидрометаноптериновый путь и формиат далее окисляется до СО<sub>2</sub> при помощи NAD-зависимых формиатдегидрогеназ. Образующийся В ходе метилотрофного роста эндогенный CO<sub>2</sub> уже используется в конструктивном метаболизме, ассимилируясь в цикле Кальвина. Наличие нескольких типов метанолдегидрогеназ и ассимиляция не только эндогенного, но и экзогенного СО<sub>2</sub>, значительно повышают адаптивный потенциал исследованных штаммов.

Установлено, что все исследованные сероокисляющие бактерии имеют дыхательный тип метаболизма. В качестве терминального акцептора электронов у всех исследованных штаммов может выступать кислород. У *T. psekupsensis* эту роль могут также выполнять ДМСО и фумарат, а у *A. thiophilum* – тетратионат. Возможность использования альтернативного акцептора электронов повышает адаптивный потенциал исследованных штаммов и служит приспособлением к меняющимся условиям среды.

Таким образом наличие чистых культур, последовательностей геномов, их анализ и экспериментальное подтверждение ряда свойств позволили не только расширить таксономическое разнообразие сероокисляющих бактерий, но также позволили выявить метаболическое разнообразие представителей родов *Beggiatoa*, *Thioflexithrix* и *Azospirillum*, их высокий адаптационный потенциал и обосновать приуроченность данных организмов к микроаэробным сероводородным биотопам.

# выводы

1. Существенно расширен состав семейства *Beggiatoaceae* – описаны и узаконены 2 новых таксона (в том числе 1 новый род): *Thioflexithrix psekupsensis* gen. nov, sp. nov. и *Beggiatoa leptomitoformis* sp. nov. Для обоих штаммов из семейства *Beggiatoaceae* и для штамма *A. thiophilum* BV-S были получены геномные последовательности, анализ которых позволил выявить метаболический потенциал данных бактерий.

**2.** Показано, что *T. psekupsensis*  $D3^{T}$  - облигатный хемолитоавтотроф, в то время как *B. leptomitoformis* D-402<sup>T</sup> и *A. thiophilum* BV-S<sup>T</sup> способны к органогетеротрофному, литогетеротрофному и литоавтотрофному росту. При литотрофном росте восстановленные соединения серы и молекулярный водород являются донорами электронов для энергетического метаболизма. *B. leptomitoformis* D-402<sup>T</sup> и *A. thiophilum* BV-S<sup>T</sup> переходят к литоавтотрофному росту только в микроаэробных условиях культивирования.

3. В геномах трех бактерий закодированы гены ферментов, окисляющие сульфид до элементной серы: *soxF*, кодирующий флавоцитохром c у T. *psekupsensis* и *B. leptomitoformis*, и *sqr*, кодирующий сульфид-хинон редуктазу у всех исследуемых бактерий. У всех трех исследуемых бактерий окисление тиосульфата происходит за счет функционирования Sox-комплекса: у нитчатых серобактерий это разветвленный, а у *A. thiophilum* - прямой Sox-путь. У *A. thiophilum* в окислении тиосульфата в микроаэробных и анаэробных условиях принимает участие тиосульфатдегидрогеназа. Литотрофный рост в присутствии H<sub>2</sub> у всех исследуемых бактерий осуществляется за счет функционирования [NiFe]-гидрогеназ.

**4.** Все три исследованных штамма способны к автотрофному росту за счет функционирования цикла Кальвина-Бенсона-Бассама. Во всех геномах отсутствует ген седогептулозо-1,7-бисфосфотазы и трансальдолазы, но эти реакции могут катализироваться фруктозо-1,6-бисфосфатазой и транскетолазой, соответственно. РБФК у *T. psekupsensis* D3 относится к форме IAq, у *B.* 

*leptomitoformis* D-402 – к форме IC, а у *А. thiophilum* BV-S – в геноме закодированы два типа РБФК: IC и IV.

**5.** *В. leptomitoformis* и *А. thiophilum* способны к метилотрофному росту при участии ТГМП-зависимого пути. Метанол может окисляться до формальдегида под действием различных метанолдегидрогеназ (mxaF, xoxF и mdh2 y *A. thiophilum* и xoxF и mdh2 y *B. leptomitoformis*). Ассимиляция C<sub>1</sub>-соединений осуществляется через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама.

**6.** Все три исследованных штамма являются диазотрофами и имеют дыхательный тип метаболизма, способны к аэробному дыханию. *T. psekupsensis* и *A. thiophilum* способны к анаэробному дыханию: в качестве терминальных акцепторов электроноу у *T. psekupsensis* может выступать ДМСО (гены *dmsABC*) и фумарат (*sdhABCD*), а у *A. thiophilum* – тетратионат (*ttrABC*).

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Белоусова Е.В. Таксономия и новые аспекты экофизиологии и метаболизма бактерий рода *Sphaerotilus*: дис. ... канд. биол. Наук. Воронеж, 2011. 153 с.
- 2. Герхард Ф. И. Методы общей бактериологии // М.: «Мир». 1984. 443-445 стр.
- 3. Грабович М. Ю. Биоразнообразие бесцветных серобактерий: таксономия, метаболизм и его регуляция: дисс. ...доктора биол. наук. Саратов, 2005. 308 с.
- Грабович М. Ю. Изучение систематики, физиологии и особенностей серного метаболизма бесцветных серобактерий: дис. ... канд. биол. Наук. – М. – 1984. – 217 с.
- 5. Грабович М. Ю., Дубинина Г. А., Дульцева Н. М., Чурикова В. В. Особенности углеродного метаболизма при хемолитогетеро- и хемоорганогетеротрофном росте нитчатых серобактерий *Thiothrix arctophila* и *Leucothrix thiophila*. // Микробиология. 1996. Т. 65. С. 149-153.
- 6. Грабович М.Ю., Дубинина Г.А., Лебедева В.Ю., Чурикова В.В. Миксотрофный и литогетеротрофный рост пресноводного штамма скользящих нитчатых серобактерий *Beggiatoa leptoimtiformis* Д-402 // Микробиология. 1998. Т. 67, № 4. С. 464-470.
- Гриднева Е. В., Грабович М. Ю., Дубинина Г. А., Черноусова Е. Ю., Акимов В. Н. Экофизиология литотрофных сероокисляющих представителей рода *Sphaerotilus* – обитателей сульфидных источников Северного Кавказа // Микробиология. – 2009. – Т. 78. – № 1. – С. 89–97.
- 8. Дорошенко Е.В., Булыгина Е.С., Спиридонова Е.М., Турова Т.П., Кравченко И.К. Выделение и характеристика азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum* из почвы сфагнового болота // Микробиология. – 2007. – Т. 76. – С. 107–115.
- 9. Дубинина Г. А., Грабович М. Ю. Выделение чистых культур *Thiospira* и изучение их серного метаболизма // Микробиология. 1983. Т. 53. С. 5-12.
- 10. Дубинина Г. А., Грабович М. Ю. Выделение, культивирование и характеристика *Macromonas bipunctata* // Микробиология. 1984. Т. 53. С. 748-755.
- 11. Дубинина Г.А., Грабович М.Ю., Чернышова Ю.Ю. Роль кислорода в регуляции метаболизма аэротолерантных спирохет основного компонента бактериальных серных матов "*Thiodendron*" // Микробиология. 2004. Т. 73. С. 725-33.
- 12. Дульцева Н. М. Таксономия и физиология новых нитчатых серобактерий: дис. ... канд. биол. наук. М, 1996. 144 с.
- 13. Дульцева Н. М., Дубинина Г. А., Лысенко А. М. Выделение морских нитчатых серобактерий и описание нового вида *Leucothrix thiophila* sp. nov. // Микробиология. 1996. Т. 65. № 1. С. 89-98.

- 14.3емлянухин А. А., Игамбердиев А. У., Преснякова Е. Н. Выделение и характеристика изоцитратлиазы из щитка кукурузы // Биохимия. 1986. Т. 51. № 3. С. 442.
- 15.Земская Т.И., Намсараев Б.Б., Дульцева Н.М., Ханаева Т.А., Голобокова Л.П., Дубинина Г.А., Дулов Л.Е., Вада Э. Экофизиологические особенности матообразующейбактерии *Thioploca* в донных осадках бухты Фролиха, Северный Байкал // Микробиология. – 2001. – Т. 70. – С. 391–397.
- 16.Земская Т.И., Черницына С.М., Дульцева Н.М., Сергеева В.Н., Погодаева Т.В., Намсараев Б.Б. Бесцветные серные бактерии рода *Thioploca* из различных районов озера Байкал // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 134–143.
- 17.Лакин Г. Ф. Биометрия // М.: «Высш. шк.». 1990. 352 стр.
- 18. Мунтян М.С., Грабовин М.Ю., Патрицкая В.Ю., Дубинина Г.А. Регуляция метаболических и электрон-транспортных путей у пресноводного штамма *Beggiatoa leptomitiformis* D-402 // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 452–459.
- 19.Патрицкая В.Ю., Грабович М.Ю., Дубинина Г.А., Мунтян М.С. Литоавтотрофный рост пресноводного штамма бесцветныхсеробактерий *Beggiatoa "leptomitiformis"* Д-402 // Микробиология. -2001. Т.70, № 2. - С. 182-188.
- 20.Резников А. А., Муликовская Е. П., Соколов В. Ю. Методы анализа природных вод. // М.: «Госгеолтехиздат». 1970. 488 стр.
- 21.Романова А. К. Биохимические методы изучения автотрофии у микроорганизмов // М.: «Наука». 1980. –160 стр.
- 22. Троценко Ю. А., Доронина Н. В., Торгонская М. Л. Аэробные метилобактерии // Пущино: «ОНТИ ПНЦ РАН». 2010. 30 стр.
- 23. Фролов Е. Н., Белоусова Е. В., Лавриненко К. С., Дубинина Г. А., Грабович М. Ю. Обнаружение способности *Azospirillum thiophilum* к литотрофии при окислении восстановленных соединений серы // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 274-283.
- 24. Черноусова Е. Ю., Акимов В. Н., Гриднева Е. В., Дубинина Г. А., Грабович М. Ю. Филогенетический *in situ/ex situ* анализ микробного сообщества серного мата из умеренно термального сульфидного источника Северного Кавказа // Микробиология. 2008. Т. 7. №2. С. 255–260.
- 25.Ahmad A., Kalanetra K. M., Nelson D. C. Cultivated *Beggiatoa* spp. define the phylogenetic root of morphologically diverse, noncultured, vacuolate sulfur bacteria // Canadian Journal of Microbiology. 2006. V. 52. P. 591–598.
- 26.Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. Basic local alignment search tool // Journal of Molecular Biology. 1990. V. 215. P. 403-10.
- 27.Angert E. R. Alternatives to binary fission in bacteria // Nature Reviews Microbiology. 2005. V. 3. P. 214-224.
- 28. Anthony C. The quinoprotein dehydrogenases for methanol and glucose // Archives of Biochemistry and Biophysics. 2004. V. 428. P. 2–9.

- 29. Anthony C., Zatman L. The microbial oxidation of methanol. The prosthetic group of the alcohol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. 27: a new oxidoreductase prosthetic group // Biochemistry. 1967 Vol. 104. P. 960–969.
- 30.Aranda C. P., Valenzuela C., Matamala Y., Godoy F. A., Aranda N. Sulphurcycling bacteria and ciliated protozoans in a *Beggiatoaceae* mat covering organically enriched sediments beneath a salmon farm in a southern Chilean fjord // Marine Pollution Bulletin. – 2015. – V. 100. – P. 270-278.
- 31.Arieli B., Shahak Y., Taglicht D., Hauska G., Padan E. Purification and characterization of sulfide-quinone reductase, a novel enzyme driving anoxygenic photosynthesis in *Oscillatoria limnetica* // Journal of Biological Chemistry. – 1994. – V. 269. – P. 5705–5711.
- 32.Axelsson R., Oxelfelt F., Lindblad P. Transcriptional regulation of the *Nostoc* uptake hydrogenase // FEMS Microbiology Letters. 1999. V. 170. P. 77–81.
- 33.Aziz R. K., Bartels D., Best A. A., DeJongh M., Disz T., Edwards R. A., Formsma K., Gerdes S., Glass E. M., Kubal M., Meyer F., Olsen G. J., Olson R., Osterman A. L., Overbeek R.A., McNeil L. K., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch G. D., Reich C., Stevens R., Vassieva O., Vonstein V., Wilke A., Zagnitko O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology // BMC Genomics. 2008. V. 9. P. 75.
- 34.Badger M. R., Bek E. J. Multiple Rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO<sub>2</sub> acquisition by the CBB cycle // Journal of Experimental Botany. 2008. V. 59. P. 1525-1541.
- 35.Bailey J. V., Flood B. E., Ricci E., Delherbe N. Imaging of cellular oxidoreductase activity suggests mixotrophic metabolisms in *Thiomargarita* spp. // MBio. 2017. V. 8. № 6. e01263-17.
- 36.Bailey J. V., Salman V., Rouse G., Schulz-Vogt H. N., Levin L. A., Orphan V. J. Dimorphism in methane seep dwelling ecotypes of the largest known bacteria // The ISME Journal. 2011. V. **5**. P. 1926–1935.
- 37.Baldani J. I., Videira S. S., Dos Santos Teixeira K. R. *et al.* The family *Rhodospirillaceae*. E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F.L. Thompson (Eds.) // The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria., Springer Berlin, Heidelberg Berlin. 2014. P. 533-618.
- 38.Barrett E. L., Clark M. A. Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate // Microbiology Reviews. 1987. –V. 51. P. 192–205.
- 39.Beauchamp R. O. Jr., Bus J. S., Popp J. A., Boreiko C. J., Andjelkovich D.A. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity // Critical Reviews in Toxicology. 1984. V. 13. P. 25-97.
- 40.Berg J. S., Schwedt A., Kreutzmann A. C., Kuypers M. M., Milucka J. Polysulfides as intermediates in the oxidation of sulfide to sulfate by *Beggiatoa* // Applied and Environmental Microbiology. 2014. V. 80. P. 629-36.
- 41.Beutler M., Milucka J., Hinck S., Schreiber F., Brock J., Mussmann M., Schulz-Vogt H. N., de Beer D. Vacuolar respiration of nitrate coupled to energy conservation in filamentous *Beggiatoaceae* // Environmental Microbiology. – 2012. – V. 14. – P. 2911–2919.

- 42.Boden R., Scott K. M. Evaluation of the genus *Thiothrix* Winogradsky 1888 (Approved Lists 1980) emend. Aruga et al. 2002: reclassification of *Thiothrix disciformis* to *Thiolinea disciformis* gen. nov., comb. nov., and of *Thiothrix flexilis* to *Thiofilum flexile* gen. nov., comb nov., with emended description of *Thiothrix //* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2018. V. 68. P. 2226-2239.
- 43.Brito B., Martínez M., Fernandéz D., Rey L., Cabrera E., Palacios J. M., Imperial J., Ruiz-Argüeso T. Hydrogenase genes from *Rhizobium leguminasorum* bv. viciae are controlled by the nitrogen fixation regulatory protein NifA // National Academy of Sciences. 1997. V. 94. P. 6019–6024.
- 44.Brock J., Rhiel E., Beutler M., Salman V., Schulz-Vogt H. N. Unusual polyphosphate inclusions observed in a marine *Beggiatoa* strain // Antonie Van Leeuwenhoek. 2012. V. 101. P. 347–357.
- 45.Brock T. D. Family IV. Leucotrichaceae Buchanan // In: Buchanan RE, Gibbons NE (eds) Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th edn. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1957. 1974. P. 118–119.
- 46.Brock T. D. The Prokaryotes-A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identificatian, Applications // N.Y. 1992. P. 3247-3255.
- 47.Bronstein M., Schütz M., Padan E., Shahak Y. Cyanobacterial sulfide-quinone reductase: cloning and heterologous expression // Journal of Bacteriology. 2000.
   V. 182. P. 3336–3344.
- 48.Brüser T., Selmer T., Dahl C. "ADP sulfurylase" from Thiobacillus denitrificans is an adenylylsulfate:phosphate adenylyltransferase and belongs to a new family of nucleotidyltransferases // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – V. 275. P. 1691–1698.
- 49.Buchanan R. E. Family III. *Leucotrichaceae* Buchanan. fam. nov. // In: Breed RS, Murray EGD, Smith NR (eds) Bergey's manual of determinative bacteriology, 7th edn. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1957. P. 850–851.
- 50.Burgess B., Lowe D. J. Mechanism of molybdenum nitrogenase // Chemical Reviews. 1996. V. 96. P. 2983-3011.
- 51.Carver T., Thomson N., Bleasby A., Berriman M., Parkhill J. DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization // Bioinformatics. 2009. V. 25. P. 119–120.
- 52.Cecagno R., Fritsch T. E., Schrank I. S. The plant growth-promoting bacteria *Azospirillum amazonense*: genomic versatility and phytohormone pathway // BioMed Research International. 2015. V. 2015. P. 898592.
- 53.Chan L. K., Morgan-Kiss R. M., Hanosn T. E. Functional analysis of three sulfide:quinone oxidoreducatse homologs in *Chlorobaculum tepidum* // Journal of Bacteriology. 2009. V. 191. P. 1026–1043.
- 54.Chernousova E, Gridneva E, Grabovich M, Dubinina G, Akimov V, Rossetti S, Kuever J. *Thiothrix caldifontis* sp. nov. and *Thiothrix lacustris* sp. nov., gammaproteobacteria isolated from sulfide springs // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2009. –V. 59. – P. 3128-3135.

- 55.Children S. E., Kenneth M. Characterization and regulation of sulfur reductase activity in *Thermotoga neapolitana* // Microbiology. 1984. V. 60. P. 2622-26.
- 56.Chistoserdova L. Modularity of methylotrophy, revisited // Environmental Microbiology. 2011. V. 13. P. 2603-22.
- 57.Chu F., Beck D. A., Lidstrom M. E. MxaY regulates the lanthanide-mediated methanol dehydrogenase switch in *Methylomicrobium buryatense* // PeerJ. 2016. V. 4. e2435.
- 58.Cort J. R., Selan U., Schulte A., Grimm F., Kennedy M. A, Dahl C. Allochromatium vinosum DsrC: Solution-state NMR structure, redox properties, and interaction with DsrEFH, a protein essential for purple sulfur bacterial sulfur oxidation // Journal of Molecular Biology. – 2008. – V. 382. – P. 692–707.
- 59.Dahl C., Engels S., Pott-Sperling A., Schulte A., Sander J., Lübbe Y., Deuster O., Brune D. C. Novel genes of the dsr gene cluster and evidence for close interaction of Dsr proteins during sulfur oxidation in the photorophic sulfur bacterium Allochromatium vinosum // Journal of Bacteriology. – 2005. – V. 187. – P. 1392– 1404.
- 60.Dahl C., Franz B., Hensen D., Kesselheim A., Zigann R. Sulfite oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: identification of SoeABC as a major player and relevance of SoxYZ in the process // Microbiology. 2013. V. 159. P. 2626-2638.
- 61.Dahl C., Trüper H.G. Comparative enzymology of sulfite oxidation in *Thiocapsa roseopersicina* strains 6311, M1, and BBS under chemotrophic and phototrophic conditions // Zeitschrift für Naturforschung. 1989. V. 44. P. 617–622.
- 62.De Albuquerque J. P., Keim C. N., Lins U. Comparative analysis of *Beggiatoa* from hypersaline and marine environments // Micron. 2010. V. 41. P. 507–517.
- 63.De Beer D., Sauter E., Niemann H., Kaul N., Foucher J. P., Witte U., Schlüter M., Boetius A. In situ fluxes and zonation of microbial activity in surface sediments of the Hakon Mosby Mud volcano // Limnology and Oceanography. – 2006. – V. 51. – P. 1315–1331.
- 64.Denkmann K., Grein F., Zigann R., Siemen A., Bergmann J., van Helmont S., Nicolai A., Pereira I. A., Dahl C. Thiosulfate dehydrogenase: a widespread and unusual acidophilic c-type cytochrome // Environmental Microbiology. 2012. V. 14. P. 2673–2688.
- 65.Dermott R., Legner M. Dense mat-forming bacterium *Thioploca ingrica* (*Beggiatoaceae*) in eastern Lake Ontario: implications to the benthic food web // Journal of Great Lakes Research. 2002. V. 28. P. 688–697.
- 66.Döbereiner J., Day J. M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixingites // In Proceedings of the First International Symposium on N<sub>2</sub> Fixation. Edited by W. E. Newton & C. J. Nyman. Pullman: Washington State University Press. – 1976. – P. 518–538.
- 67. Dubinina G., Grabovich M., Leshcheva N., Rainey F. A., Gavrish E. Spirochaeta perfilievii sp. nov., an oxygen-tolerant, sulfide-oxidizing, sulfur- and thiosulfate-

reducing spirochaete isolated from a saline spring // International journal of systematic and evolutionary microbiology. -2011. - V. 61. - P. 110-117.

- 68.Dubinina G., Savvichev A., Orlova M., Gavrish E., Verbarg S., Grabovich M. Beggiatoa leptomitoformis sp. nov., the first freshwater member of the genus capable of chemolithoautotrophic growth // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2017. V. 67. P. 197–204.
- 69.Edgcomb V. P., Kysela D. T., Teske A., de Vera Gomez A., Sogin M. L. Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – V. 99. – P. 7658– 7662.
- 70.Egorov A. M., Avilova T. V., Dikov M. M., Popov V. O., Rodionov Y. V., Berezin I. V. NAD+-dependent formate dehydrogenase from methyllotrophic bacterium strain. Purification and characterization // European Journal of Biochemistry. 1979. V. 99. P. 569–576.
- 71.Elsen S., Dischert W., Colbeau A/, Bauer C. E. Expression of uptake hydrogenase and molybdenum nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is coregulated by the RegB-RegA two-component regulatory system // Journal of Bacteriology. – 2000.
  – V. 182. – P. 2831–2837.
- 72.Emerson D., Ghiorse W. C. Role of disulfide bonds in maintaining the structural integrity of the sheath of *Leptothrix discophora* SP-6 // Journal of Bacteriology. 1993. V. 175. № 24. P. 7819-27.
- 73.Farquhar G. J., Boyle W. C. Identification of filamentous microorganisms in activated sludge // Journal of the Water Pollution Control Federation. – 1971. – V. 43. – P. 604-22.
- 74.Flood B. E., Fliss P., Jones D. S., Dick G. J., Jain S., Kaster A. K., Winkel M., Mußmann M., Bailey J. Single-cell (meta-)genomics of a dimorphic "*Candidatus* Thiomargarita nelsonii" reveals genomic plasticity // Frontiers in Microbiology. – 2016. – V. 7. – P. 603.
- 75.Fomenkov A., Vincze T., Grabovich M., Anton B. P., Dubinina G., Orlova M., Belousova E., Roberts R. J. Complete Genome Sequence of a Strain of *Azospirillum thiophilum* Isolated from a Sulfide Spring // Genome Announcements. – 2016. – V. 4. - № 1. – e01521-15.
- 76.Foote N., Thompson A. C., Barber D., Greenwood C. Pseudomonas cytochrome C-551 peroxidase. A purification procedure and study of CO-binding kinetics // Biochemical Journal. 1983. V. 209. № 3. P. 701–707.
- 77.Fossing H., Gallardo V. A., Jørgensen B. B., Hüttel M., Nielsen L. P., Schulz H., Canfield D. E., Forster S., Glud R. N., Gundersen J. K., Küver J., Ramsing N. B., Teske A., Thamdrup B., Ulloa O. Concentration and transport of nitrate by the matforming sulphur bacterium *Thioploca* // Nature. – 1995. – V. 374. – P. 713–715.
- 78.Friedrich C. G., Bardischewsky F., Rother D., Quentmeier A., Fischer J. Prokaryotic sulfur oxidation // Current Opinion in Microbiology. 2005. V. 8. P. 253–259.
- 79. Friedrich C. G., Rother D., Bardischewsky F., Quentmeier A., Fischer J. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: Emergence of a common

mechanism? // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. - V. 67. - P. 2873 - 2882.

- 80.Frigaard N-U., Bryant D. A. Genomic insights into the sulfur metabolism of phototrophic green sulfur bacteria. In Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms // Edited by Hell R, Dahl C, Knaff DB, Leustek T. Dordrecht: Springer. - 2008. - P. 337–355.
- 81.Frigaard N-U., Dahl C. Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria // Advances in Microbial Physiology. 2008. V. 54. P. 103–200.
- 82.Gallardo V. A. Large benthic microbial communities in sulfide biota under Peru-Chile subsurface countercurrent // Nature. – 1977. – V. 268. – P. 331–332.
- 83.Garcia-Pichel F., Mechling M., Castenholz R. W. Diel migration of microorganisms within a benthic, hypersaline mat community // Applied and Environmental Microbiology. 1994. V. 60. P. 1500–1511.
- 84.Garrity G. M., Bell J. A., Lilburn T. Family I. Thiotrichaceae fam. nov. // In: Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 2, part B., New York, Springer. 2005. P. 131–179.
- 85.Ghosh W., Dam B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea // FEMS Microbiology Reviews. 2009. V. 33. P. 999–1043.
- 86.Gillan D. C., Speksnijder A. G., Zwart G., De Ridder C. Genetic diversity of the biofilm covering Montacuta ferruginosa (Mollusca, Bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA // Applied and Environmental Microbiology. – 1998. – Vol. 64. – P. 3464–3472.
- 87.Girnth A-C., Grünke S., Lichtschlag A., Felden J., Knittel K., Wenzhöfer F., de Beer D., Boetius A. A novel, matforming *Thiomargarita* population associated with a sulfidic fluid flow from a deep-sea mud volcano // Environmental Microbiology. 2011. V. 13. P. 495–505.
- 88.Grabovich M. Y., Patritskaya V. Y., Muntyan M. S., Dubinina G. A. Lithoautotrophic growth of the freshwater strain *Beggiatoa* D-402 and energy conservation in a homogenous culture under microoxic conditions // FEMS Microbiology Letters. 2001. V. 204, P. 341–345.
- 89.Grabovich My., Muntyan M. S., Lebedeva V. Yu., Ustiyan V. S., Dubinina G. A. Lithoheterotrophic growth and electron transfer chain components of the filamentous gliding bacterium *Leucothrix mucor* DSM 2157 during oxidation of sulfur compounds // FEMS Microbiology Letters. – 1999. – V. 178. – P. 155-161.
- 90.Gregersen L. H., Bryant D. A., Frigaard N. U. Mechanisms and evolution of oxidative sulfur metabolism in green sulfur bacteria // Frontiers in Microbiology. – 2011. – V. 2. – e116.
- 91.Griesbeck C., Schütz M., Schödel T., Bathe S., Nausch L., Mederer N., Vielreicher M., Hauska G. Mechanism of sulfide-quinone reductase investigated using sitedirected mutagenesis and sulfur analysis // Biochemistry. – 2002. – V. 41. – P. 11552–11565.

- 92.Grimm F., Franz B., Dahl C. Thiosulfate and sulfur oxidation in purple sulfur bacteria // In Microbial Sulfur Metabolism (Dahl, C. and Friedrich, C.G., eds.), chapter 9. Springer-Verlag. 2008. P. 101–116.
- 93.Grouzdev D. S., Tikhonova E. N., Krutkina M. S., Kravchenko I. K. Genome Sequence of Methylotrophic *Azospirillum* sp. Strain B2, Isolated from a Raised Sphagnum Bog // Genome Announcements. 2018. V. 6. e00492-18.
- 94.Grünke S., Felden J., Lichtschlag A., Girnth A. C., De Beer D., Wenzhöfer F., Boetius A. Niche differentiation among mat-forming, sulfide-oxidizing bacteria at cold seeps of the Nile Deep Sea Fan (Eastern Mediterranean Sea) // Geobiology. -2011. – V. 9. – P. 330–348.
- 95.Grünke S., Lichtschlag A., de Beer D., Felden J., Salman V., Ramette A., Schulz-Vogt H. N., Boetius A. Mats of psychrophilic thiotrophic bacteria associated with cold seeps of the Barents Sea // Biogeosciences. – 2012. – V. 9. – P. 2947–2960.
- 96.Grünke S., Lichtschlag A., de Beer D., Kuypers M., Lösekann-Behrens T., Ramette A., Boetius A. Novel observations of *Thiobacterium*, a sulfur-storing Gammaproteobacterium producing gelatinous mats // ISME J. 2010. 4. P. 1031-1043.
- 97.Güde H., Strohl W. R., Larkin J. M. Mixotrophic and heterotrophic growth of *Beggiatoa alba* in continuous culture // Archives of Microbiology. – 1981. – V. 129. – P. 357-60.
- 98.Hagen K. D., Nelson D. C. Organic carbon utilization by obligately and facultatively autotrophic *Beggiatoa* strains in homogeneous and gradient cultures // Applied and Environmental Microbiology. 1996. V. 62. P. 947–953.
- 99.Hagen K. D., Nelson D. C. Use of reduced sulfur compounds by *Beggiatoa* spp.: enzymology and physiology of marine freshwater strains in homogeneous and gradient cultures // Applied and Environmental Microbiology. – 1997. – V. 63. – P. 3957–3964.
- 100. Hanson T. E., Tabita F. R. Insights into the stress response and sulfur metabolism revealed by proteome analysis of a *Chlorobium tepidum* mutant lacking the Rubisco-like protein // Photosynthesis Research. – 2003. – V. 78. – P. 231–48.
- 101. Happe T., Schütz K., Böhme H. Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabena variabilis* ATCC 29431 // Journal of Bacteriology. – 2000. – V. 182. – P. 1624–1631.
- 102. Heijs S. K., Damste J. S. S., Forney L. J. Characterization of a deep-sea microbial mat from an active cold seep at the Milano mud volcano in the Eastern Mediterranean Sea // FEMS Microbiology Ecology. 2005. V. 54. P. 47–56.
- 103. Hensen D., Sperling D., Trüper H. G., Brune D. C., Dahl C. Thiosulphate oxidation in the phototrophic sulphur bacterium *Allochromatium vinosum* // Molecular Microbiology. 2006. V. 62. P. 794–810.
- 104. Hibi Y., Asai K., Arafuka H., Hamajima M., Iwama T., Kawai K. Molecular structure of La3?-induced methanol dehydrogenaselike protein in *Methylobacterium radiotolerans* // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2011. – V. 111. – P. 547–549.

- 105. Hinck S. Eco-physiological, chemotactic and taxonomic characterization of hypersaline *Beggiatoa* originating from microbial mats // The University of Bremen Ph.D thesis. 2008. P. 149.
- 106. Hinck S., Mussmann M., Salman V., Neu T. R., Lenk S., Beer Dd., Jonkers H. M. Vacuolated *Beggiatoa*-like filaments from different hypersaline environments form a novel genus // Environmental Microbiology. 2011. V. 12. P. 3194–3205.
- 107. Hinck S., Neu T. R., Lavik G., Mussmann M., de Beer D., Jonkers H. M. Physiological adaptation of a nitrate-storing *Beggiatoa* sp. to diel cycling in a phototrophic hypersaline mat // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – V. 73. – P. 7013–7022.
- 108. Hinze G. *Thiophysa volutans*, ein neues Schwefelbakterium // Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft. 1903. V. 21. P. 309–316.
- 109. Hinze G. Über den Bau der Zellen von *Beggiatoa mirabilis* Cohn // Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 1901. V. 19. P. 369–374.
- 110. Høgslund S., Nielsen J. L., Nielsen L. P. Distribution, ecology and molecular identification of *Thioploca* from Danish brackish water sediments // FEMS Microbiology Ecology. – 2010. – V. 73. – P. 110–120.
- 111. Hoiczyk E. Structural and biochemical analysis of the sheath of *Phormidium uncinatum* // Journal of Bacteriology. 1998. V. 180. P. 3923–3932.
- 112. Howarth R., Unz R. F., Seviour E. M., Blackall L. L., Pickup R. W., Jones J. G., Yaguchi J., Head I. M. Phylogenetic relationships of filamentous sulfur bacteria (*Thiothrix* spp. and Eikelboom type 021N bacteria) isolated from wastewatertreatment plants and description of *Thiothrix eikelboomii* sp. nov., *Thiothrix unzii* sp. nov., *Thiothrix fructosivorans* sp. nov. and *Thiothrix defluvii* sp. nov. // International journal of systematic bacteriology. – 1999. – V. 49. – P. 1817–1827.
- 113. Huff A. Revisiting Methylotrophy: The Impact of Lantanides and Lanthanide-Dependent Enzymes on The Methylotrophic Metabolic Network // Microbiology and Molecular Genetics. – 2017. – V. 17. – P.408-421.
- 114. Jannasch H. W., Nelson D. C., Wirsen C. O. Massive natural occurrence of unusually large bacteria (*Beggiatoa* spp.) at a hydrothermal deep-sea vent site // Nature. – 1989. – V. 342. – P. 834–836.
- 115. Jean M. R., Gonzalez-Rizzo S., Gauffre-Autelin P., Lengger S. K., Schouten S., Gros O. Two new *Beggiatoa* species inhabiting marine mangrove sediments in the Caribbean // PLoS One. 2015. V. 10. e0117832.
- 116. Jewell T., Huston S. L., Nelson D. C. Methylotrophy in freshwater *Beggiatoa alba* strains // Applied and Environmental Microbiology. 2008. V. 74. P. 5575–5578.
- 117. Jones D. S, Flood B. E., Bailey J. V. Metatranscriptomic analysis of diminutive *Thiomargarita*-like bacteria ("*Candidatus* Thiopilula" spp.) from abyssal cold seeps of the Barbados accretionary prism // Applied and Environmental Microbiology. – 2015. – V. 81. – P. 3142–3156.
- 118. Jørgensen B. B. Distribution of colorless sulfur bacteria (*Beggiatoa* spp.) in a coastal marine sediment // Marine Biology. 1977. V. 41. P. 19–28.

- 119. Jørgensen B. B., Dunker R., Grünke S., Roy H. Filamentous sulfur bacteria, *Beggiatoa* spp., in arctic marine sediments (Svalbard, 79 degrees N) // FEMS Microbiology Ecology. – 2010. – V. 73. – P. 500–513.
- 120. Jørgensen B. B., Gallardo V. A. *Thioploca* spp.: filamentous sulfur bacteria with nitrate vacuoles // FEMS Microbiology Ecology. 1999. V. 28. P. 301–313.
- 121. Kalanetra K. M., Huston S. L., Nelson D. C. Novel, attached, sulfuroxidizing bacteria at shallow hydrothermal vents possess vacuoles not involved in respiratory nitrate accumulation // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – V. 70. – P. 7487–7496.
- 122. Kalanetra K. M., Joye S. B., Sunseri N. R., Nelson D. C. Novel vacuolate sulfur bacteria from the Gulf of Mexico reproduce by reductive division in three dimensions // Environmental Microbiology. 2005. V. 7. P. 1451–1460.
- 123. Kalanetra K. M., Nelson D. C. Vacuolate-attached filaments: highly productive Ridgeia piscesae epibionts at the Juan de Fuca hydrothermal vents // Marine Biology. – 2010. – V. 157. – P. 791–800.
- 124. Kalyuzhnaya M. G., Hristova K. R., Lidstrom M. E., Chistoserdova L. Characterization of a novel methanol dehydrogenase in representatives of *Burkholderiales*: Implications for environmental detection of methylotrophy and evidence for convergent evolution // Journal of Bacteriology. – 2008. – Vol. 190. – P. 3817–3823.
- 125. Kamp A., Roy H., Schulz-Vogt H. N. Video-supported analysis of *Beggiatoa* filament growth, breakage, and movement // Microbial Ecology. 2008. V. 56. P. 484–491.
- 126. Kanagawa T., Kamagata Y., Aruga S., Kohno T., Horn M., Wagner M. Phylogenetic analysis of and oligonucleotide probe development for Eikelboom type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge // Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – V. 66. – P. 5043–5052.
- 127. Kappler U. Bacterial sulfite-oxidizing enzymes // Biochimica et Biophysica Acta. 2011. V. 1807. P. 1-10.
- 128. Kappler U., Bennett B., Rethmeier J., Schwarz G., Deutzmann R., McEwan A. G., Dahl C. Sulfite:cytochrome c oxidireductase from *Thiobacillus novellus*. Purification, characterization, and molecular biology of a heterodimeric member of the sulfite oxidase family // The Journal of Biological Chemistry. 2000. V. 275. P. 13202–13212.
- 129. Kappler U., Dahl C. Enzymology and molecular biology of prokaryotic sulfite oxidation // FEMS Microbiology Letters. 2001. V. 203. P. 1–9.
- 130. Kappler U., Maher M. J. The bacterial SoxAX cytochromes // Cellular and Molecular Life Sciences. 2013. V. 70. P. 977–992.
- 131. Kawasaki Y., Kondo K., Narizuka R., Endo T., Katahira M., Kawamura I., Sato M., Takeda M. Presence of N-L-lactyl-D-perosamine residue in the sheath-forming polysaccharide of *Thiothrix fructosivorans* // International Journal of Biological Macromolecules. 2016. V. 82. P. 772-779.
- Keil F. Beiträge zur Physiologie der farblosen Schwefelbacterien // Beiträge zur Biologie der Pflanzen. – 1912. – V. 11. – P. 335-372.

- 133. Kelly D. P., Wood A. P., Jordan S. L., Padden A. N., Gorlenko V. M., Dubinina G. A. Biological production and consumption of gaseous organic sulphur compounds // Biochemical Society Transactions. 1994. V. 22. 1011–1015.
- 134. Kirchhof G., Reis V. M., Baldani J. I., Eckert B., Döbereiner J., Hartmann A. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants // Plant and Soil. 1997. V. 194. P. 45–55.
- 135. Kisker C., Schindelin H., Baas D., Rétey J., Meckenstock R. U., Kroneck P. M. A structural comparison of molybdenum cofactor-containing enzymes // FEMS Microbiology Reviews. – 1998. – V. 22. – P. 503–521.
- 136. Kleiner M., Wentrup C., Lott C., Teeling H., Wetzel S., Young J., Chang Y. J., Shah M., VerBerkmoes N. C., Zarzycki J., Fuchs G., Markert S., Hempel K., Voigt B., Becher D., Liebeke M., Lalk M., Albrecht D., Hecker M., Schweder T., Dubilier N. Metaproteomics of a gutless marine worm and its symbiotic microbial community reveal unusual pathways for carbon and energy use // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – V. 109. – E1173-82.
- 137. Kojima H., Fukui M. Phylogenetic analysis of *Beggiatoa* spp. from organic rich sediment of Tokyo Bay, Japan // Water Research. 2003. 37. P. 3216–3223.
- 138. Kojima H., Nakajima T., Fukui M. Carbon source utilization and accumulation of respiration-related substances by freshwater *Thioploca* species // FEMS Microbiology Ecology. 2007. 59. P. 23–31.
- 139. Kolkwitz R. Über die schwefelbakterie // Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft. 1955. V. 68. P. 374–380.
- 140. Kondo K., Takeda M., Ejima W., Kawasaki Y., Umezu T., Yamada M., Koizumi J., Mashima T., Katahira M. Study of a novel glycoconjugate, thiopeptidoglycan, and a novel polysaccharide lyase, thiopeptidoglycan lyase // International Journal of Biological Macromolecules. 2011. V. 48. P. 256-62.
- 141. Kondo K., Umezu T., Shimura S., Narizuka R., Koizumi J., Mashima T., Katahira M., Takeda M. Structure of perosamine-containing polysaccharide, a component of the sheath of *Thiothrix fructosivorans* // International Journal of Biological Macromolecules. – 2013. – V. 59. – 59-66.
- 142. Koppe F. Die Schlammflora der ostholsteinischen Seen und des Bodensees // Archiv fur Hydrobiologie. 1924. V. 14. P. 619–672.
- 143. Krause S., Johnson T., Samadhi Karunaratne Y., Fu Y., Beck D. A., Chistoserdova L., Lidstrom M. E. Lanthanide-dependent cross-feeding of methanederived carbon is linked by microbial community interactions // PNAS Early Edition. – 2016. – V. 45. – P.1120-1127.
- 144. Kreutzmann A. C. Electron donors and acceptors for members of the family *Beggiatoaceae* // The University of Bremen Ph.D thesis. 2013.
- 145. Kreutzmann A. C., Schulz-Vogt H. N. Oxidation of molecular hydrogen by a chemolithoautotrophic *Beggiatoa* strain // Applied and Environmental Microbiology. 2016. V. 82. P. 2527-36.

- 146. Kuznetsov S. I., Dubinina G. A. Methods of Investigation of Aqueous Microorganisms. In: Yu I and Sorokin M (editors) // Moscow: «Nauka». – 1989. – P. 285.
- 147. Kwak Y., Shin J-H. First *Azospirillum* genome from aquatic environments: Whole-genome sequence of *Azospirillum thiophilum* BV-S<sup>T</sup>, a novel diazotroph harboring a capacity of sulfur-chemolithotrophy from a sulfide spring // Marine Genomics. 2016. V. 25. P. 21-24.
- 148. Ladha J. K., So R. B., Watanabe I. Composition of *Azospirillum* species associated with wetland rice plants grown in different soils // Plant and Soil. – 1987. – V. 102. – P. 127–129.
- 149. Lane D. J., Harrison A. P., Stahl D., Pace B., Giovannoni S. J., Olsen G. J., Pace N. R. Evolutionary relationships among sulfur- and iron-oxidizing eubacteria // Journal of Bacteriology. 1992. V. 174. P. 269–278
- 150. Lapage S. P., Sneath P. H. A., Lessel E. F., Skerman V. B. D., Seeliger H. P. R., Clark W. A., editors. International code of nomenclature of bacteria: bacteriological code, 1990 Revision // ASM Press, Washington, DC. – 1992.
- 151. Larkin J. M., Henk M. C. Filamentous sulfide-oxidizing bacteria at hydrocarbon seeps of the Gulf of Mexico // Microscopy Research and Technique. – 1996. – V. 33. – P. 23–31.
- 152. Larkin J. M., Henk M. C., Aharon P. *Beggiatoa* in microbial mats at hydrocarbon vents in the Gulf of Mexico and Warm Mineral Springs, Florida // Geo-Marine Letters. - 1994. – V. 14. – P. 97–103.
- 153. Larkin J. M., Shinabarger D. L. Characterization of *Thiothrix nivea* // International journal of systematic bacteriology. 1983. V. 33. P. 841–846.
- 154. Laue B. E., Nelson D. C. Characterization of the gene encoding the autotrophic ATP sulfurylase from the bacterial endosymbiont of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila* // Journal of Bacteriology. 1994. V. 176. P. 3723–3729.
- 155. Lavrinenko K., Chernousova E., Gridneva E., Dubinina G., Akimov V., Kuever J., Lysenko A., Grabovich M. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2010. V. 60. P. 2832-2837.
- 156. Leadbetter E. R. Family II. *Beggiatoaceae* // In: Buchanan RE, Gibbons NE (eds) Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th edn. The Williams & Wilkins Company, Baltimore. 1974. P. 112–116.
- 157. Lehmann S., Johnston A. W. B., Curson A. R. J. SoeABC, a novel sulfite dehydrogenase in the *Roseobacters?* // In Programme & Abstract Book EMBO Workshop on Microbial Sulfur Metabolism, Noordwijkerhout. 2012. P. 29.
- 158. Lidstrom M. E. Aerobic methylotrophic procaryotes // In The Prokaryotes. Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, and Schleifer K-H (eds). New York, NY, USA: Springer-Verlag. – 2006. - P. 618–634.
- 159. Lidstrom M. E., Anthony C., Biville F. New unified nomenclature for genes involved in the oxidation of methanol in gram-negative bacteria // FEMS Microbiology Letters. 1994. V. 117. P. 103–06.
- 160. Lin S-Y., Hameed A., Liu Y-C., Gasser F., Goodwin P., Hanson R. S., Harms N. Azospirillum soli sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from agriculture soil // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2015. V. 65. P. 4601–4607.
- 161. Lin S-Y., Hameed A., Shen F-T., Liu Y. C., Hsu Y. H., Shahina M., Lai W. A., Young C. C. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. // Antonie van Leeuwenhoek. – 2014. – V. 105. – P. 1149–1162.
- 162. Lin S-Y., Young C-C., Hupfer H., Siering C., Arun A. B., Chen W. M., Lai W. A., Shen F. T., Rekha P. D., Yassin A. F. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2009. V. 59. P. 761–765.
- 163. López-García P., Duperron S., Philippot P., Foriel J., Susini J., Moreira D. Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilonproteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge // Environmental Microbiology. – 2003. – V. 5. – P. 961–976.
- 164. Loschi L., Brokx S., Hills T. L., Zhang G., Bertero M. G., Lovering A. L., Weiner J. H., Strynadka N. C. Structural and biochemical identification of a novel bacterial oxidoreductase // The Journal of Biological Chemistry. – 2004. – V. 279. – P. 50391–50400.
- 165. Lowry O. H., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. J. Protein measurement with the folin pihenold reagent // The Journal of Biological Chemistry. 1951. V. 193. P. 265-75.
- 166. Loy A., Duller S., Baranyi C., Mussmann M., Ott J., Sharon I., Béjà O., Le Paslier D., Dahl C., Wagner M. Reverse dissimilatory sulfite reductase as a phylogenetic marker for a subgroup of sulfur-oxidizing prokaryotes // Environmental Microbiology. - 2009. – V. 11. – P. 289–299.
- 167. MacGregor B. J., Biddle J. F., Siebert J. R., Staunton E., Hegg E. L., Matthysse A. G., Teske A. Why orange Guaymas Basin *Beggiatoa* spp. are orange: single-filament-genomeenabled identification of an abundant octaheme cytochrome // Applied and Environmental Microbiology. 2013. V. 79. № 4. P. 1183-90.
- 168. MacGregor B. J., Biddle J. F., Siebert J. R., Staunton E., Hegg E. L., Matthysse A. G., Teske A. Why Orange Guaymas Basin Beggiatoa spp. Are Orange: Single-Filament-Genome-Enabled Identification of an Abundant Octaheme Cytochrome with hydroxylamine oxidase, hydrazine oxidase, and nitrite reductase activities // Applied and Environmental Microbiology. – 2013. – V. 79. – P. 1183–1190.
- 169. MacGregor B. J., Biddle J. F., Teske A. Mobile elements in a single-filament orange Guaymas Basin Beggiatoa ("Candidatus Maribeggiatoa") sp. draft genome: evidence for genetic exchange with cyanobacteria // Applied and Environmental Microbiology. – 2013. – V. 79. – № 13. – P. 3974-85.

- 170. MacGregor B. J., Biddle J. F., Teske A. Mobile elements in a single-filament orange Guaymas Basin Beggiatoa sp. genome: evidence for genetic exchange with cyanobacteria // Appl Environ Microbiol. 2013. V. 79. № 13. P. 3974-85.
- 171. Maier S., Gallardo V. A. Nutritional characteristics of two marine thioplocas determined by autoradiography // Archives of Microbiology. – 1984. – V. 139. – P. 218–220.
- 172. Maier S., Murray R. G. E. Fine structure of *Thioploca ingrica* and a comparison with *Beggiatoa* // Canadian Journal of Microbiology. 1965. V. 11. P. 645–652.
- 173. Maier S., Preissner W. C. Occurrence of *Thioploca* in Lake Constance and Lower Saxony, Germany // Microbial Ecology. 1979. V. 5. P. 117–119.
- 174. Marcia M., Ermler U., Peng G., Michel H. A new structure-based classification of sulfide:quinone oxidoreductases // Proteins. 2010. V. 78. P. 1073–1083.
- 175. Marmur J. A. Procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms // Journal of Molecular Biology. 1961. V. 3. P. 208–218.
- 176. Martinez-Espinosa R. M., Dridge E. J., Bonete M. J., Butt J. N., Butler C. S., Sargent F., Richardson D. J. Look on the positive side! The orientation, identification and bioenergetics of 'Archaeal' membrane-bound nitrate reductases // FEMS Microbiology Letters. – 2007. – V. 276. – P. 129–39.
- 177. McHatton S. C., Barry J. P., Jannasch H. W., Nelson D. C. High nitrate concentrations in vacuolate, autotrophic marine *Beggiatoa* // Applied and Environmental Microbiology. 1996. V. 62. P. 954–958.
- 178. McKay L. J., MacGregor B. J., Biddle J. F., Albert D. B., Mendlovitz H. P., Hoer D. R., Lipp J. S., Lloyd K. G., Teske A. P. Spatial heterogeneity and underlying geochemistry of phylogenetically diverse orange and white *Beggiatoa* mats in Guaymas Basin hydrothermal sediments // Deep-Sea Research Part I. 2012. V. 67. P. 21–31.
- 179. Meyer B., Kuever J. Molecular analysis of the distribution and phylogeny of dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate reductase-encoding genes (*aprBA*) among sulfur-oxidizing prokaryotes // Microbiology. – 2007. – V. 153. – P. 3478– 3498.
- 180. Mezzino M. J., Strohl W. R., Larkin J. M. Characterization of *Beggiatoa alba* // Archives of Microbiology. 1984. V. 137. P. 139–144.
- 181. Moriya Y., Itoh M., Okuda S., Yoshizawa A. C., Kanehisa M. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server // Nucleic Acids Research. 2007. V. 35. P. 182-85.
- 182. Morris H. E., Lacombe R. F., Lane W. H. Quantitative determination of elemental sulfur in aromatic hydrocarbons // Analytical Chemistry. – 1948. -V. 20. - P. 1037-1039.
- 183. Müller F., Banderias T. M., Urich T., Teixeira M., Gomes C. M., Kletzin A. Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidorductase // Molecular Microbiology. – 2004. – V. 53. – P. 1147–1160.

- 184. Mussmann M., Hu F. Z., Richter M., de Beer D., Preisler A., Jørgensen B. B., Huntemann M., Glöckner F. O., Amann R., Koopman W. J., Lasken R. S., Janto B., Hogg J., Stoodley P., Boissy R., Ehrlich G. D. Insights into the genome of large sulfur bacteria revealed by analysis of single filaments // PLOS Biology. – 2007. – V. 5. – P. 1923–1937.
- 185. Nakagawa T., Mitsui R., Tani A., Sasa K., Tashiro S., Iwama T., Hayakawa T., Kawai K. A catalytic role of XoxF1 as La<sup>3+</sup>-dependent methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* strain AM1 // PLoS ONE. - 2012. - V. 7. - № 11. e50480.
- 186. Nelson D. C., Castenholz R. W. Use of reduced sulfur compounds by *Beggiatoa* sp. // Journal of Bacteriology. 1981. V. 147. P. 140–154.
- 187. Nelson D. C., Jannasch H. W. Chemoautotrophic growth of a marine *Beggiatoa* in sulfide-gradient cultures // Archives of Microbiology. 1983. V. 136. P. 262–269.
- 188. Nelson D. C., Jørgensen B. B., Revsbech N. P. Growth pattern and yield of a chemoautotrophic *Beggiatoa* sp. in oxygen-sulfide microgradients // Applied and Environmental Microbiology. – 1986. – V. 52. – P. 225–233.
- 189. Nelson D. C., Waterbury J. B., Jannasch H. W. Nitrogen-fixation and nitrate utilization by marine and freshwater *Beggiatoa* // Archives of Microbiology. 1982. V. 133. P. 172–177.
- 190. Nelson D. C., Wirsen C. O., Jannasch H. W. Characterization of large, autotrophic *Beggiatoa* spp. abundant at hydrothermal vents of the Guaymas Basin // Applied and Environmental Microbiology. 1989. V. 55. P. 2909–2917.
- 191. Nishino M., Fukui M., Nakajima T. Dense mats of *Thioploca*, gliding filamentous sulfur-oxidizing bacteria in Lake Biwa, central Japan // Water Research. 1998. V. 32. P. 953–957.
- 192. Nübel T., Klughammer C., Huber R., Hauska G., Schütz M. Sulfide:quinone oxidoreductase in membranes of the hyperthermophilic archaeon *Aquifex aeolicus* // Archives of Microbiology. 2000. V. 173. P. 233–244.
- 193. Orlova M., Rogozhin E., Fomenkov A., Grabovich M. Expression and purification of a recombinant thiosulfate dehydrogenase from *Azospirillum thiophilum* BV-S and its structural characterization // 7th FEMS 2017 Congress of European microbiologists / July 9-13, 2017, Valencia, Spain
- 194. Otte S., Kuenen G., Nielsen L. P., Paerl H. W., Zopfi J., Schulz H. N., Teske A., Strotmann B., Gallardo V.A., Jorgensen B. B. Nitrogen, carbon, and sulfur metabolism in natural *Thioploca* samples // Applied and Environmental Microbiology. – 1999. – V. 65. – P. 3148–3157.
- 195. Pace N. R., Olsen G. J., Woese C. R. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent // Cell. 1986. V. 45. P. 325–326.
- 196. Parks D.H., Chuvochina M., Waite D.W., Rinke C., Skarshewski A., Chaumeil P.A., Hugenholtz P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life // Nature Biotechnology. 2018. V.36. P. 996-1004.

- 197. Peck H.D. Adenosine-5'-phosphosulfate as an intermediate in the oxidation of thiosulfate by *Thiobacillus thioparus* // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1960. – V. 46 – P. 1053–1057.
- 198. Peplies J., Kottmann R., Ludwig W., Glöckner F. O. A standard operating procedure for phylogenetic inference (SOPPI) using (rRNA) marker genes // Systematic and Applied Microbiology. 2008. V. 31. P. 251–257.
- 199. Pfennig N., Lippert K. D. Über das vitamin B12-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien // Archives of Microbiology. 1966. V. 55. P. 425–432.
- 200. Pires R. H., Lourenco A. I., Morais F., Teixeira M., Xavier A. V., Saraiva L. M., Pereira I. A. A novel membrane-bound respiratory complex from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 // Biochimica et Biophysica Acta. – 2003. – V. 1605. – P. 67–82.
- 201. Prince R. C., Stokley K. E., Haith C. E., Jannasch H. W. The cytochromes of a marine *Beggiatoa* // Archives of Microbiology. 1988. V. 150. P. 193–196.
- 202. Prokopenko M. G., Hirst M. B., De Brabandere L., Lawrence D. J., Berelson W. M., Granger J., Chang B. X., Dawson S., Crane E. J. 3rd, Chong L., Thamdrup B., Townsend-Small A., Sigman D. M. Nitrogen losses in anoxic marine sediments driven by *Thioploca*-anammox bacterial consortia // Nature. 2013. V. 500. P. 194–198.
- 203. Ramos A. R., Keller K. L., Wall J. D., Pereira I. A. The membrane QmoABC complex interacts directly with the dissimilatory adenosine 5'-phosphosulfate reductase in sulfate reducing bacteria // Frontiers in Microbiology. 2012. V. 3. P. 137.
- 204. Reiffenstein R. J., Hulbert W. C., Roth S. H. Toxicology of hydrogen sulfide // Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 1992. V. 32. P. 109-134.
- 205. Renosto F., Martin R.L., Borrell J.L., Nelson D.C., Segel I.H. ATP sulfurylase from trophosome tissue of Riftia pachyptila (hydrothermal vent tube worm) // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1991. V. 290. P. 66–78.
- 206. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. // Journal of cell biology. 1963. V.17. P. 208-213.
- 207. Reynolds F. A., Haines, T. A. Effects of chronic exposure to hydrogen sulfide on newly hatched brown trout Salmo trutta L. // Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological. 1980. V. 22. P. 1- 17.
- 208. Reyns S., Leonis G. La fumarase de poulet. 6. Effet des inhibiteurs sur l'active enzymatique // Archives internationales de physiologie et de biochimie. 1974. V. 82. № 5. P. 1007.
- 209. Rice S. C., Pon N. G. The aconitase of yeast. II crystallisation and general properties of yeast aconitase // The Journal of Biochemistry. 1975. V. 77. № 2. P. 367-372.
- 210. Richard C. La tetrathionate reductase (TTR) chez les bacilles a gram negatif: interet diagnostique et epidemiloqique // Bulletin de l'Institut Pasteur. 1977. V. 75. P. 369–82.
- 211. Rodriguez J., Hiras J., Hanson T. E. Sulfite oxidation in *Chlorobaculum tepidum* // Frontiers in Microbiology. 2011. V. 2. P. 112.

- 212. Romano A. H., Peloquin J. P. Composition of the sheath of *Sphaerotilus natans* // Journal of Bacteriology. 1963. V. 86. P. 252-258.
- 213. Salman V., Amann R., Girnth A-C., Polerecky L., Bailey J. V., Høgslund S., Jessen G., Pantoja S., Schulz-Vogt H. N. A single-cell sequencing approach to the classification of large, vacuolated sulfur bacteria // Systematic and Applied Microbiology. – 2011. – V. 34. – P. 243–259.
- 214. Salman V., Amann R., Shub D. A., Schulz-Vogt H. N. Multiple self-splicing introns in the 16S rRNA genes of giant sulfur bacteria // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012. V. 109. P. 4203–4208.
- 215. Salman V., Bailey J. V., Teske A. Phylogenetic and morphologic complexity of giant sulphur bacteria // Antonie Van Leeuwenhoek. 2013. V. 104. P. 169-86.
- 216. Salman-Carvalho V., Fadeev E., Joye S. B., Teske A. How clonal is clonal? Genome plasticity across multicellular segments of a "*Candidatus* Marithrix sp." filament from sulfidic, briny seafloor sediments in the Gulf of Mexico // Frontiers in Microbiology. 2016. V. 7. P. 1173.
- 217. Sander J., Engels-Schwarzlose S., Dahl C. Importance of the DsrMKJOP complex for sulfur oxidation in *Allochromatium vinosum* and phylogenetic analysis of related complexes in other prokaryotes // Archives of Microbiology. 2006. V. 186. P. 357–366.
- 218. Sant'Anna F. H., Almeida L. G. P., Cecagno R., Reolon L. A., Siqueira F. M., Machado M. R., Vasconcelos A. T., Schrank I. S. Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense* // BMC Genomics. – 2011. – V. 12. – P. 409.
- 219. Saravanakumar C., Dineshkumar N., Alavandi S. V., Salman V., Poornima M., Kalaimani N. Enrichment and identification of large filamentous sulfur bacteria related to *Beggiatoa* species from brackishwater ecosystems of Tamil Nadu along the southeast coast of India // Systematic and Applied Microbiology. – 2012. – V. 35. – P. 396–403.
- 220. Sasser M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids // USFCC Newsl. -1990. V. 20. P. 16.
- 221. Sawardecker J. S., Sloneker J. H., Jeans A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography // Anal. Chem. 1965. V. 37. P. 1602-1603.
- 222. Sayama M. Presence of nitrate-accumulating sulfur bacteria and their influence on nitrogen cycling in a shallow coastal marine sediment // Applied and Environmental Microbiology. 2001. V. 67. P. 3481–3487.
- 223. Sayama M., Risgaard-Petersen N., Nielsen L. P., Fossing H., Christensen P. B. Impact of bacterial NO3 - transport on sediment biogeochemistry // Applied and Environmental Microbiology. - Applied and Environmental Microbiology. - 2005. - V. 71. - P. 7575-7577.
- 224. Schewiakoff W. Über einen neuen bacterienähnlichen Organismus des Süsswassers // Habilitation thesis, University Heidelberg, Heidelberg. – 1892. – P. 36.

- 225. Schmidt T. M., Arieli B., Cohen Y., Padan E., Strohl W. R. Sulfur metabolism in *Beggiatoa alba* // Journal of Bacteriology. 1987. V. 169. P. 5466–5472.
- 226. Schulz H. N., Brinkhoff T., Ferdelman T. G., Mariné M. H., Teske A., Jorgensen B. B. Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian shelf sediments // Science. 1999. V. 284. P. 493–495.
- 227. Schulz H. N., De Beer D. Uptake rates of oxygen and sulfide measured with individual *Thiomargarita namibiensis* cells by using microelectrodes // Applied and Environmental Microbiology. 2002. V. 68. P. 5746–5749.
- 228. Schulz H. N., Jørgensen B. B. Big bacteria // Annual Review of Microbiology. 2001. V. 55. P. 105–137.
- 229. Schulz H. N., Schulz H. D. Large sulfur bacteria and the formation of phosphorite // Science. 2005. V. 307. P. 416–418.
- 230. Schütz M., Shahak Y., Padan E., Hauska G. Sulfide-quinone reductase from *Rhodobacter capsulatus* // The Journal of Biological Chemistry. 1997. V. 272. P. 9890–9894.
- 231. Schwedt A., Kreutzmann A-C., Polerecky L., Schulz-Vogt H. N. Sulfur respiration in a marine chemolithoautotrophic *Beggiatoa* strain // Frontiers in Microbiology. 2012. V. 2. P. 276.
- 232. Sekar R., Mills D. K., Remily E. R., Voss J. D., Richardson L. L. Microbial communities in the surface mucopolysaccharide layer and the black band microbial mat of black banddiseased Siderastrea siderea // Applied and Environmental Microbiology. 2006. V. 72. P. 5963–5973.
- 233. Siering P. L., Ghiorse W. C. Phylogeny of the Sphaerotilus-Leptothrix group inferred from morphological comparisons, genomic fingerprinting, and 16s ribosomal DNA sequence analyses // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1996. – V. 46. – P. 173–182.
- 234. Smith A. J., Lascelles J. Thiosulphate metabolism and rhodanese in *Chromatium* sp. strain D // Microbiology. 1966. V. 42. P. 357–370.
- 235. Sorbo B. N. // Rhodanase. Methods in Enzymology II. N.Y. 1955. P. 334-337.
- 236. Soutar A., Crill P. A. Sedimentation and climatic patterns in the Santa Barbara Basin during 19th and 20th centuries // Geological Society of America Bulletin. 1977. V. 88. P. 1161–1172.
- 237. Stevens H., Ulloa O. Bacterial diversity in the oxygen minimum zone of the eastern tropical South Pacific // Environmental Microbiology. 2008. V. 10. P. 1244–1259.
- 238. Strohl W. R. Family I. *Beggiatoaceae* // In: Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 3, 1st edn. The Williams & Wilkins Company, Baltimore. 1989. P. 2089–2106.
- 239. Strohl W. R., Cannon G. C., Shively J. M., Güde H., Hook L. A., Lane C. M., Larkin J. M. Heterotrophic carbon metabolism by *Beggiatoa alba* // Journal of Bacteriology. – 1981. – V. 148. – P. 572–583.

- 240. Strohl W. R., Larkin J. M. Enumeration, isolation, and characterization of Beggiatoa from freshwater sediments // Applied and Environmental Microbiology. – 1978. – V. 36. – P. 755–770.
- 241. Sweerts J-P. R. A., De Beer D., Nielsen N. P., Verdouw H., Heuvel J. C. Van den, Cohen Y., Cappenberg T. E. Denitrification by sulfur oxidizing Beggiatoa spp. mats on freshwater sediments // Nature. 1990. V. 344. P. 762 763.
- 242. Takeda M., Kondo K., Yamada M., Koizumi J., Mashima T., Matsugami A., Katahira M. Solubilization and structural determination of a glycoconjugate which is assembled into the sheath of *Leptothrix cholodnii* // International Journal of Biological Macromolecules. 2010. V. 46. P. 206–211.
- 243. Takeda M., Umezu T., Kawasaki Y., Shimura S., Kondo K., Koizumi J. A spatial relationship between sheath elongation and cell proliferation in *Sphaerotilus natans* // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2012. V. 76. P. 2357-2359.
- 244. Tamoi M., Ishikawa T., Takeda T., Shigeoka S. Molecular characterization and resistance to hydrogen peroxide of two fructose-1,6-bisphosphatases from *Synechococcus* PCC 7942 // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1996. V. 334. P. 27-36.
- 245. Teske A., Ramsing N. B., Küver J., Fossing H. Phylogeny of *Thioploca* and related filamentous sulfide-oxidizing bacteria // Systematic and Applied Microbiology. 1995. V. 18. P. 517–526.
- 246. Teske A., Salman V. "The family *Beggiatoaceae*" // In The Prokaryotes: *Gammaproteobacteria*, eds E. Rosenberg, E. F. Delong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. L. Thompson (Berlin-Heidelberg: Springer). 2014. P. 93–143.
- 247. Trüper H. G., Pfennig N. Sulphur metabolism in *Thiorhodaceae*. III. Storage and turnover of thiosulphate sulphur in *Thiocapsa floridana* and *Chromatium* species // Antonie van Leeuwenhoek. 1966. V. 32. P. 261–276.
- 248. Van Niel C. B. Family A. Achromatiaceae Massart // In: Breed RS, Murray EGD, Hitchens AP (eds) Bergey's manual of determinative bacteriology, 6th edn. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. 1948. P. 997–999.
- 249. van Veen W. L., Mulder E. G., Deinema M. H. The *Sphaerotilus-Leptothrix* group of bacteria // Microbiological Reviews. 1978. V. 42. P. 329–356.
- 250. van Veen W. L., van der Kooij D., Geuze E. C., van der Vlies A. W. Investigations on sheathed bacterium *Haliscomenobacter hydrossis* gen. nov., sp. nov., isolated from activated sludge // The Journal of Microbiology. – 1973. – V. 39. – P. 207-216.
- 251. Veeger C. B., Devatanin B. W. Succinate Dehydrogenase // Meth. enzyme citric acid cycle. 1969. V. 23. P. 81-90.
- 252. Vignais P. M. Hydrogenases and H+-reduction in primary energy conservation // In Results and Problems in Cell Differentiation (Schäfer G. and Penefsky HS, eds.), Springer-Verlag. – 2008. – V. 45. – P. 223–252.
- 253. Vignais P. M., Billoud B. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: and overview // Chemical Reviews. 2007. V. 107. P. 4206–4272.

- 254. Vignais P. M., Billoud B., Meyer J. Classification and phylogeny of hydrogenases // FEMS Microbiology Reviews. 2001. V. 25. P. 455–501.
- 255. Volbeda A., Charon M. H., Piras C., Hatchikian E. C., Frey M., Fontecilla-Camps J. C. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas* // Nature. – 1995. – V. 373. – P. 580–87.
- 256. Vu H., Subuyuj G. A., Vijayakumar S. Good N. M., Martinez-Gomez N. C., Skovran E. Lanthanide-Dependent Regulation of Methanol Oxidation Systems in *Methylobacterium extorquens* AM1 and Their Contribution to Methanol Growth // Journal of Bacteriology. – 2016.–V. 198. – P.1250-1260.
- 257. Wakai S., Tsujita M., Kikumoto M., Manchur M. A., Kanao T., Kamimura K. Purification and characterization of sulfide:quinone oxidoreductase from an acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans* // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2007. V. 71. P. 2735–2742.
- 258. Wehrmann M., Billard P., Martin-Meriadec A., Zegeye A., Klebensberger J. Functional Role of Lanthanides in Enzymatic Activity and Transcriptional Regulation of Pyrroloquinoline Quinone- Dependent Alcohol Dehydrogenases in *Pseudomonas putida* KT2440 // American society for microbiology. – 2017. – V. 8. – P. 1-14.
- 259. Weissgerber T., Dobler N., Polen T., Latus J., Stockdreher Y., Dahl C. Genomewide transcriptional profiling of the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* DSM 180<sup>T</sup> during growth on different reduced sulfur compounds // Journal of Bacteriology. – 2013. – V. 195. – P. 4231-45.
- 260. Wilbur K. M., Anderson N. G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase // The Journal of Biological Chemistry. 1948. V. 176. P. 147-154.
- 261. Williams L. A., Reimers C. Role of bacterial mats in oxygen-deficient marine basins and coastal upwelling regimes: preliminary report // Geology. 1983. V. 11. P. 267–269.
- 262. Williams T. M., Unz R. F. Filamentous sulfur bacteria of activated sludge // Microbiology. 1985. V. 49. P. 887-898.
- 263. Winkel M., Salman-Carvalho V., Woyke T., Richter M., Schulz-Vogt H. N., Flood B. E., Bailey J. V., Mußmann M. Single-cell sequencing of *Thiomargarita* reveals genomic flexibility for adaptation to dynamic redox conditions // Frontiers in Microbiology. – 2016. – V. 7. – P. 964.
- 264. Winogradsky S. N. Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Bacterien // Heft 1. Zur Morphologie und Physiologie der Schwefelbacterien: Leipzig. – 1888. – P. 1–120.
- 265. Winogradsky S. N. Über Schwefelbacterien // Botanische Zeitung. 1887. V. 45. P. 489–610.
- 266. Winterbourn C. C., Garcia R. C., Segal A. W. Production of the superoxide adduct of myeloperoxidase (compound III) by stimulated human neutrophils and its reactivity with hydrogen peroxide and chloride // Biochemical Journal. 1985. V. 228. № 3. P. 583–592.

- 267. Wislouch S. M. *Thioploca ingrica* nov. sp. // Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft. 1912. V. 30. P. 470–474.
- 268. Wolf I., Buhrke T., Dernedde J. Pohlmann A., Friedrich B. Duplication of hyp genes involved in maturation of [NiFe] hydrogenases in *Alcaligenes eutrophus* H16 // Archives of Microbiology. 1998. V. 170. P. 451-59.
- 269. Wu L. F., Mandrand M. A. Microbial hydrogenases: Primary structure, classification, signatures and phylogeny // FEMS Microbiology Letters. 1993. V. 104. P. 243–269.
- 270. Yarza P., Yilmaz P., Pruesse E., Glöckner F. O., Ludwig W., Schleifer K. H., Whitman W. B., Euzéby J., Amann R., Rosselló-Móra R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences // Nature Reviews Microbiology – 2014. V. 12. – P. 635-645.
- 271. Young C-C., Hupfer H., Siering C., Ho M. J., Arun A. B., Lai W. A., Rekha P. D., Shen F. T., Hung M. H., Chen W. M., Yassin A. F. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil // Microbiology Society Journals. 2008. V. 58. P. 959–963.
- 272. Zane G. M., Yen H. C., Wall J. D. Effect of the deletion of *qmoABC* and the promoter-distal gene encoding a hypothetical protein on sulfate reduction in *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* // Applied and Environmental Microbiology. 2010. V. 76. P. 5500–5509.
- 273. Zhou S., Han L., Wang Y., Yang G., Zhuang L., Hu P. Azospirillum humicireducens sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2013. V. 63. P. 2618–2624.
- 274. Zippel B., Neu T. R. Characterization of glycoconjugates of extracellular polymeric substances in tufa-associated biofilms by using fluorescence lectinbinding analysis // Applied and Environmental Microbiology. – 2011. – V. 77. – P. 505-16.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица П1. Гены, кодирующие метаболические ферменты *Thioflexithrix psekupsensis* D3, которые обсуждаются в работе. Гены организованы в соответствии с принадлежностью к метаболическим путям.

	5	
№ в генбанке	Название фермента	Ген
Гликолиз		
WP_086486723	Полифосфат глюкокиназа (ЕС 2.7.1.63)	glk
WP_086488623	Глюкозо-6-фосфат изомераза (ЕС 5.3.1.9)	pgi
WP_086487757	6-фосфофруктокиназа 1 (ЕС 2.7.1.11)	pfk
WP_086489509	Фруктозо-1,6-бисфосфатаза, тип I (ЕС 3.1.3.11)	fbp
WP_086488188	Фруктозо-бисфосфат альдолаза, класс II (ЕС 4.1.2.13)	fbaA
WP_086487681	Фруктозо-бисфосфат альдолаза, класс I (ЕС 4.1.2.13)	fbaB
WP_086488401	Триозофосфатизомераза (ЕС 5.3.1.1)	tpi
WP_086488191	NADPH-зависимая глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа	gapA
	(EC 1.2.1.13)/ NAD- зависимая глицеральдегид-3-фосфат	
	дегидрогеназа (EC 1.2.1.12)	
WP_086488190	Фосфоглицераткиназа (ЕС 2.7.2.3)	pgk
WP_086487928	2,3-бисфосфоглицерат-зависимая фосфоглицерат мутаза (ЕС	bipgmA
	5.4.2.11)	
WP_086489555	Енолаза (ЕС 4.2.1.11)	eno
WP_086488189	Пируваткиназа (ЕС 2.7.1.40)	pyk
	Биосинтез ЭПС	
WP_086487173	Альфа-D-глюкозофосфат-специфичная фосфоглюкомутаза	Pgm
WP_086488295	UTPглюкозо-1-фосфат уридилтрансфераза	galF
WP_086489415	UDP-глюкозо-4-эпимираза	galE
WP_086489336	UDP-галактопиранозомутаза	glf
	ЦТК и глиоксилатный цикл	
WP_086486847	Цитратсинтаза (EC 2.3.3.1)	gltA
WP_086488039	Аконитатгидратаза 2 (ЕС 4.2.1.3)	acnB
WP_086489225	Изоцитратдегидрогеназа (NADP-зависимая) (EC 1.1.1.42)	idh
WP_086488055	2-оксоглутаратдегидрогеназа E1 компонент (EC 1.2.4.2)	sucA
WP_086487002	Сукцинил-СоА-синтетаза альфа субъединица (ЕС 6.2.1.5)	sucD
WP_086487003	Сукцинил-СоА-синтетаза бета субъединица (ЕС 6.2.1.5)	sucC
WP_086489374	Сукцинатдегидрогеназа, флавоцитохромная	sdhA
WP_086489372	субъединица	sdhC
WP_086489373	Сукцинатдегидрогеназа, субъединица циттохром	sdhD
WP_086489375	b556	sdhB
	Сукцинатдегидрогеназа, мембрансвязывающая	
	субъединица	
NUD 006400151	Сукцинатдегидрогеназа, железосерная субъединица	
WP_086489151	Фумаратгидратаза, класс I ( ЕС 4.2.1.2)	fumA
WP_086488056	Малатдегидрогеназа (NAD-зависимая) (EC 1.1.1.37)	mdh
WP_086486628	Изоцитратлиаза (ЕС 4.1.3.1)	aceA
WP_086486735	Малатсинтаза А (EC 2.3.3.9)	aceB
WP_086487300	Малатдегидрогеназа (оксалоацетат-декарбоксилирующая)	maeB
WP_086486914	(NADP <sup>+</sup> ); малик-энзим (предположительно) (EC 1.1.1.40)	

Цикл Кальвина-Бенсона-Бассама		
WP_086488040	Фосфорибулокиназа (ЕС 2.7.1.19)	prkB
WP_086488997	Рибулозобисфосфаткарбоксилаза, малая субъединица (ЕС 4.1.1.39)	rbcS
WP_086488998	Рибулозобисфосфаткарбоксилаза, большая субъединица (ЕС 4.1.1.39)	rbcL
WP_086488190	Фосфоглицераткиназа (ЕС 2.7.2.3)	pgk
WP_086488191	NAD-зависимая глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ЕС	gapA
	1.2.1.12)	
WP_086488401	Триозофосфатизомераза (ЕС 5.3.1.1)	tpiA
WP_086487681	Фруктозобисфосфатальдолаза, класс I (ЕС 4.1.2.13)	fbaB
WP_086488188	Фруктозобисфосфатальдолаза, класс II (ЕС 4.1.2.13)	fbaA
WP_086489509	фруктозо-1,6-бисфосфатаза, тип I (ЕС 3.1.3.11)	fbp
WP_086488192	Транскетолаза (EC 2.2.1.1)	tktA
WP_086489399	Рибулозо-фосфат-3-эпимераза (ЕС 5.1.3.1)	rpe
WP_086489601	Рибозо 5-фосфат изомераза А (ЕС 5.3.1.6)	rpiA
	Ферменты антиоксидантной защиты	
WP_086489036.1	Супероксиддисмутаза [Fe] (ЕС 1.15.1.1)	sodB
WP_086487816.1	Супероксиддисмутаза [Cu-Zn] precursor (EC 1.15.1.1)	sodC
WP_086488662.1	Цитохром c <sub>551</sub> пероксидаза (ЕС 1.11.1.5)	сср
	Серный метаболизм	
WP 086488810	Тиосульфат-окисляющий белок-переносчик SoxY	soxY
WP 086488713	Тиосульфат-окисляющий комплексный белок-переносчик SoxZ	soxZ
WP_086487844	Сероокисляющий цитохром с-типа SoxA	soxA
WP_086488324	Питохром С	soxF
WP_086488907	Тиосульфогидролаза SoxB	soxB
	Диссимиляторная сульфитредуктаза, альфа субъединица (ЕС	dsrA
	1.8.99.3)	
WP_086487871	Диссимиляторная сульфитредуктаза, бета субъединица (ЕС 1.8.99.3)	dsrB
WP_086487872	Серотрансферазный комплекс, субъединица TusD	dsrE
WP_086487873	Серотрансферазный комплекс, субъединица TusC	dsrF
WP_086487874	Серотрансферазный комплекс, субъединица TusB	dsrH
WP_086486773	TusE/DsrC/DsvC семейство серных белков	dsrC
WP_086487875		
WP_086487876	Комплекс DsrMKJOP, связанный с восстановлением серы, белок DsrM (= HmeC)	dsrM
WP_086487877	Комплекс DsrMKJOP, связанный с восстановлением серы, белок (=HmeD)	dsrK
WP_086487878	Малая субъединица глутаматсинтазо-подобного белка [NADPH],	dsrL
	кластеризующегося с сульфитредуктазой	
WP_086487879	Комплекс DsrMKJOP, связанный с восстановлением серы,	,dsrJ
	мультигемный белок DsrJ (=HmeF)	
WP_086487880	Комплекс DsrMKJOP, связанный с восстановлением серы,	dsr0
	железо-серный белок DsrO (=HmeA)	
WP_086487881	Комплекс DsrMKJOP, связанный с восстановлением серы белок	dsrP
$\mathbf{WD}  00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00  00$		1 N7
WP_08048/883	кооириновая кислота А,С-диамид синтаза	asriv

WP_086487884	IscA-подобный белок, DsrR	dsrR
	Фиксация молекулярного азота	
WP_086486810	Нитрогеназный (молибдо-железный)-специфический	nifA
WP_086486809	транскрипционный регулятор NifA	
WP_086488267	Цистеин десульфураза (EC 2.8.1.7), NifS подсемейство	nifS
WP_086488268	Железо-серный кластер белков-сборщиков NifU	nifU
WP_086488220	Нитрогеназный FeMo-кофактор синтеза FeS ядра и сборки белка	a <i>nifB</i>
WP_086488221 WP_086489582	NIIВ 4Fe-4S ферредоксин, нитрогеназо-связанный	nifX
WP_086489583	Нитрогеназный FeMo-кофактор белка-переносчика NifX	nifX2
WP_086487842	NifX-связанный белок	nifE
WP_086489581	Нитрогеназный FeMo-кофактор и сборщик белка NifN	nifN
WP_086488439	Нитрогеназный FeMo-кофактор и сборщик белка NifE	nifQ
WP_086489666	Нитрогеназный FeMo-кофактор синтеза белка доставки молибдена NifQ	4nifV
WP_086489669	Гомоцитрат синтаза (ЕС 2.3.3.14)	nifW
WP_086489671	Нитрогеназостабилизирующий/защищающий белок NifW	nifM
WP_086487138	Нитрогеназо(молибдо-железо)редуктаза и белок созревания NifH	nifH
WP_086487137	Нитрогеназа(молибдо-железо) альфа субъединица (ЕС 1.18.6.1)	nifD
WP_086487136	Нитрогеназа(молибдо-железо) бета субъединица (ЕС 1.18.6.1)	nifK
WP_086489670	NifZ белок	nifZ
WP_086487135	NifT белок	nifT
WP_086488223	Нитрогеназо-связанный белок NifO	nifO

Таблица П2. Гены, кодирующие метаболические ферменты *Beggiatoa leptomitoformis* D-402, которые обсуждаются в работе. Гены организованы в соответствии с принадлежностью к метаболическим путям

Идентификатор	Предсказанная функция	Ген
гена		
	Метанолдегидрогеназы	
WP_062154153.1	PQQ-зависимая метанолдегидрогеназа хохF-типа	xoxF
WP_062149546.1	PQQ-зависимая метанолдегидрогеназа mdh2-типа	mdh2
	РОО-биосинтез	
WP_083991600	Белок-предшественник пирохинолинхинона РодА	pqqA
WP_062149928	Белок биосинтеза пирохинолинхинона РодВ	pqqB
WP_062151155	Белок биосинтеза пирохинолинхинона РодС	pqqC
WP 062151152	Белок биосинтеза пирохинолинхинона PqqD	pqqD
WP 062151148	Белок биосинтеза пирохинолинхинона РодЕ	pqqE
	Тетрагидрометаноптериновый путь	
WP_062151897	Формальдегид-активирующий белок	fae
WP 062147700	Метилентетрагидрометаноптерин дегидрогеназа (ЕС 1.5.99.9)	mtdB
WP_062147707	Метилентетрагидрометаноптерин циклогидролаза (ЕС 3.5.4.27)	mch
WP_062154268	Формилметанофуран дегидрогеназа субъединица А (ЕС 1.2.99.5)	fhcA
WP_062153344	Формилметанофуран дегидрогеназа субъединица В (ЕС 1.2.99.5)	fhcB
WP_062152679	Формилметанофуран дегидрогеназа субъединица С (ЕС 1.2.99.5)	fhcC
WP_062152677	Формилметанофуран — тетрагидрометаноптерин N- формилтрансфераза (ЕС 2.3.1.101)	fhcD
WP_062155332	GHMP киназа (бета-рибофуранозиламинобензен 5'- фосфат синтаза)	mptG
	Формиатдегидрогеназы	<u> </u>
WP_062152634	Формиатдегидрогеназа субъединица альфа (ЕС 1.2.1.2)	fdh2A
WP_062152636	NAD-зависимая формиатдегидрогеназа субъединица бета	fdh2B
WP_062152638	NAD- зависимая формиатдегидрогеназа субъединица гамма	fdh2C
WP_062152631	NAD- зависимая формиатдегидрогеназа субъединица дельта	fdh2D
	Цикл Кальвина-Бенсона-Бассама	
WP_062155278	Рибулозо-бисфосфат-карбоксилаза большая субъединица (EC:4.1.1.39)	rbcL
WP_062147438	Рибулозо-бисфосфат-карбоксилаза малая субъединица (EC:4.1.1.39)	rbcS
WP_062151495	Фосфоглицераткиназае (ЕС:2.7.2.3)	pgk
WP_062148328	Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа тип I / NAD- зависимая глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (EC 1.2.1.12)	gapA
WP_062150001	Фруктозо- 1,6-бисфосфатаза класс I (ЕС 3.1.3.11)	fbp
WP_062148337	Транскетолаза (EC:2.2.1.1)	tktA
WP_062155281	Рибозо-5-фосфат изомераза А	rpiA
WP_062147997	Рибулозо-фосфат 3-эпимераза	rpe
WP_062148871	Фосфорибулокиназа (ЕС 2.7.1.19)	prkB
WP_062148713	Триозофосфатизомераза	tpiA
WP_062150135	Предполагаемый RuBisCo-экспрессирующий белок CbbX	cbbX

Дыхательная цепь		
Комплекс 1 NADH-дегидрогеназа		
WP_062152057	NADH-убихинон-оксидоредуктаза субъединица (ЕС 1.6.5.3)	пиоА
WP_062152060	NADH-убихинон-оксидоредуктаза субъединица В (ЕС 1.6.5.3)	nouB
WP_062152062	NADH-убихинон-оксидоредуктаза субъединица С (ЕС 1.6.5.3)	пиоС
WP_062152065	NADH-убихинон-оксидоредуктаза субъединица D (ЕС 1.6.5.3)	nuoD
WP_062155447	NADH-убихинон-оксидоредуктаза субъединица Е (ЕС 1.6.5.3)	nuoE
WP_062152068	NADH-убихинон-оксидоредуктаза субъединица F (EC 1.6.5.3)	nuoF
WP_062152071	NADH-убихинон-оксидоредуктаза субъединица G (ЕС 1.6.5.3)	nuoG
WP_062152074	NADH-убихинон-оксидоредуктаза субъединица Н (ЕС 1.6.5.3)	пиоН
WP_062152087	NADH-убихинон-оксидоредуктаза субъединица I (ЕС 1.6.5.3)	nuoI
WP_062152093	NADH-убихинон-оксидоредуктаза субъединица J (ЕС 1.6.5.3)	nuoJ
WP_062152096	NADH-убихинон-оксидоредуктаза субъединица К (ЕС 1.6.5.3)	nuoK
WP_062152098	NADH-убихинон-оксидоредуктаза субъединица L (ЕС 1.6.5.3)	nuoL
WP_062152101	NADH-убихинон-оксидоредуктаза субъединица М (ЕС 1.6.5.3)	пиоМ
WP_062152104	NADH-убихинон-оксидоредуктаза субъединица N (EC 1.6.5.3)	nuoN
	Комплекс II (сукцинатдегидрогеназа)	
WP_062150176	Сукцинатдегидрогеназа цитохром b-556 субъединица	sdhC
WP_062150173	Сукцинатдегидрогеназа железо-серный белок (ЕС 1.3.99.1)	sdhB
WP_062150170	Сукцинатдегидрогеназа субъединица флавопротеина (ЕС	sdhA
	1.3.99.1)	
WP_062150167	Сукцинатдегидрогеназа гидрофобный мембран-связывающий	sdhD
	белок	
	Комплекс III	
WP_062152394	Убихинол-цитохром с редуктаза железо-серная субъединица	rip1
WP 062152396	(EC 1.10.2.2)	cvtR
WP_062152398	Убихинол-цитохром с редуктаза цитохром с субъединица	cycl
<u>WI_002152570</u>	Комплекс IV (терминальные оксилазы)	CyCI
WP 062150429	Шитохром с оксидаза cbb3-типа субъелиница I (FC 1 9 3 1)	ccoN
WP_062150426	Цитохром с оксидаза сооз типа субъединица I	ccoO
WP_062150420	Цитохром с оксидаза собътний субъединица II	ccoP
	АТФаза	0001
WP_062152127	Субъелиница а H <sup>+</sup> -транспортной АТФазы F-типа	atnB
WP_062152131	Субъединица и П Пранспортной АТФазы Г типа	atpE atpF
WP_062152130	Субъединица с АТФ синтазы сектор F0	atp <b>r</b> atpE
WP_062152135	Субъединица альфа Н <sup>+</sup> -транспортной АТФазы Е-типа (ЕС	atpL atnA
	3.6.3.14)	aipi i
WP_062152139	Субъединица бета H <sup>+</sup> -транспортной АТФазы F-типа (ЕС	atpD
	3.6.3.14)	
WP_062152133	F субъединица дельта Н'-транспортной АТФазы F-типа	atpH
WP_062152141	Субъединица эпсилон Н'-транспортнои А I Фазы F-типа	atpC
WP_062152137	уоъединица гамма н -транспортнои АТФазы F-типа	atpG
Гранспортеры фосфатов		
WP_062151435	Неорганическая пирофосфатаза (ЕС 3.6.1.1)	рра
WP_062155562	Полифосфаткиназа (EC 2.7.4.1)	ppk
	Фиксация молекулярного азота	
WP_062149170	Нитрогеназный (молибдо-железный)-специфический транскрипционный регулятор NifA	nifA

WP_062150674	Цистеин десульфураза (ЕС 2.8.1.7), NifS подсемейство	nifS
WP_062150677	Железо-серный кластер белков-сборщиков NifU	nifU
WP_062155580	Нитрогеназный FeMo-кофактор синтеза FeS ядра и сборки	nifB
	белка NifB	
WP_062149047	4Fe-4S ферредоксин, нитрогеназо-связанный	nifX
WP_062149044	Нитрогеназный FeMo-кофактор и сборщик белка NifN	nifN
WP_062155293	Нитрогеназный FeMo-кофактор и сборщик белка NifE	nifE
WP_062155582	Нитрогеназный FeMo-кофактор синтеза белка доставки	nifQ
	молибдена NifQ	-
WP_062153266	Гомоцитрат синтаза (ЕС 2.3.3.14)	nifV
WP_062153269	Нитрогеназостабилизирующий/защищающий белок NifW	nifW
WP_062149234	Нитрогеназо(молибдо-железо)редуктаза и белок созревания	nifH
	NifH	
WP_062149237	Нитрогеназа(молибдо-железо) альфа субъединица (ЕС	nifD
	1.18.6.1)	
WP_062149239	Нитрогеназа(молибдо-железо) бета субъединица (ЕС 1.18.6.1)	nifK
WP_062153270	NifZ белок	nifZ
WP_062149242	NifT белок	nifT

Таблица П3. Гены, кодирующие метаболические ферменты Azospirillum thiophilum BV-S <sup>T</sup> ,
которые обсуждаются в работе. Гены организованы в соответствии с принадлежностью к
метаболическим путям.

Идентификатор	Предсказанная функция	Ген
гена		
ЦТК, 1	глиоксилатный цикл и выход на конструктивный метаболиз	М
WP_045584945	Цитратсинтаза (EC 2.3.3.1)	gltA
WP_045580025		
WP_045580432	Аконитатгидратаза (ЕС 4.2.1.3)	acnA
WP_045583112	Аконитатгидратаза 2 (ЕС 4.2.1.3)	acnB
WP_045580235	Изоцитратдегидрогеназа (NADP-зависимая) (EC 1.1.1.42)	idh
WP_045580242	Изоцитратдегидрогеназа (NAD-зависимая) (ЕС 1.1.1.41)	
WP_045581681	2-оксоглутаратдегидрогеназа Е1 (ЕС 1.2.4.2)	sucA
WP_045584335	2-оксоглутаратдегидрогеназа Е1 компонент	
WP_045581680	2-оксоглутаратдегидрогеназа Е2 комплекс (ЕС 2.3.1.61)	sucB
WP_045584128	сукцинил-СоА синтетаза альфа субъединица (ЕС 6.2.1.5)	sucD
WP_045581682		
WP_045584129	сукцинил-СоА синтетаза бета субъединица (ЕС 6.2.1.5)	sucC
WP_045581683		
WP_045581433	Сукцинатдегидрогеназа флавопротеиновая субъединица	sdhA
WP_045581435	Сукцинатдегидрогеназа цитохром b556 субъединица	sdhC
WP_045581434	Сукцинатдегидрогеназа мембран-связывающая субъединица	sdhD
WP_045581432	Сукцинатдегидрогеназа железо-серная субъединица	sdhB
WP_045585963	Фумаратгидратаза, класс I ( ЕС 4.2.1.2)	fumA
WP_045580292	Фумаратгидратаза, класс II (ЕС 4.2.1.2)	fumC
WP_045581684	Малатдегидрогеназа (NAD-зависимая) (ЕС 1.1.1.37)	mdh
WP_045583683	Изоцитратлиаза (ЕС 4.1.3.1)	aceA
WP_045583240	Малатсинтаза G (ЕС 2.3.3.9)	glcB
WP_045581107	Малатсинтаза A (EC 2.3.3.9)	aceB
WP_045584531	Малатдегидрогеназа (оксалоацетат-декарбоксилирующая)	maeB
WP_045581347	(NADP+); 'малик'-энзим (неопределенный) (ЕС 1.1.1.40)	
WP_045584963	Фосфоенолпируваткарбоксилаза (ЕС 4.1.1.31)	ppc
WP_045581375	Фосфоенолпируваткарбоксикиназа (GTP) (ЕС 4.1.1.32)	pckA
WP_045581214	Аспартатаминотрансфераза (ЕС 2.6.1.1)	aspC
WP_045585820		
WP_052710246	NAD-специфичная глутамат дегидрогеназа (EC 1.4.1.2)	gdh
Гликолиз (1	Путь Эмбдена-Мейергофа (ЭМ)) и цикл Кальвина-Бенсона-Ба	ассама
WP_045582979	глюкокиназа (EC 2.7.1.2)	glk
WP_045581623		
WP_045581909	глюкозо-6-фосфатизомераза (ЕС 5.3.1.9)	pgi
WP_045580285	6-фосфофруктокиназа 1 (EC 2.7.1.11)	pfk
WP_045583124	Фруктозо-бисфосфатальдолаза, класс II (ЕС 4.1.2.13)	fbaA
WP_045580602	Фруктозо-бисфосфатальдолаза, класс I (ЕС 4.1.2.13)	fbaB
WP_045582217	Триозофосфатизомераза (ЕС 5.3.1.1)	tpi

WP_045585897	NADPH-зависимая глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ЕС	gapA
WP_045580598	1.2.1.13)/ NAD-зависимая глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	
	(EC 1.2.1.12)	
WP_045581729	Фосфоглицераткиназа (ЕС 2.7.2.3)	pgk
WP_045584487	2,3-бисфосфоглицерат-зависимая фосфоглицератмутаза (ЕС 5.4.2.11)	bipgmA
WP_045580895	2,3-бисфосфоглицерат-независимая фосфоглицератмутаза (ЕС 5.4.2.12)	bipgmI
WP_045585893	Енолаза (ЕС 4.2.1.11)	eno
WP_045584166		
WP_045585776		1
WP_045584466	Пируваткиназа (ЕС 2.7.1.40)	рук
WP_045583725		
WP_045582667		
WP_045582254	Пируватдегидрогеназа Е1 компонент альфа субъединица (EC 1.2.4.1)	pdhA
WP_045586037	Пируватдегидрогеназа E1 компонент бета субъединица (EC 1.2.4.1)	pdhB
WP_045585677	Пируватдегидрогеназа Е1 компонент (ЕС 1.2.4.1)	aceE
WP_045580085	Пируватдегидрогеназа Е2 компонент (дигидролипоамид	pdhC
	ацетилтрансфераза) (ЕС 2.3.1.12)	
WP_045580087	Дигидролипоилдегидрогеназа (EC 1.8.1.4)	dld
WP_045581037		
WP_045584963	Фосфоенолпируваткарбоксилаза (ЕС 4.1.1.31)	ррс
WP_045581375	Фосфоенолпируваткарбоксикиназа (GTP) (ЕС 4.1.1.32)	pck
WP_045582217	Триозофосфатизомераза (ЕС 5.3.1.1)	tpi
WP_045585730	Транскетолаза (ЕС 2.2.1.1)	tktA
WP_045580597		
$WF_045580560$	Ducana 5 hasharmana A (EC 5 2 1 6)	uni A
WP_0455800302	$r_{\mu\nu}$	rpiA
WP_043380080	риоулозо-фосфат 5-энимераза (EC 5.1.5.1)	rpe ahhD
$\frac{AL072_{10303}}{WD_{045592129}}$	Гранскрипционный регулятор Кибізсо-оперона Собк	CDDK whaI
WF_045565126	4.1.1.39)	IDCL
WP_045583127	Рибулозобисфосфаткарбоксилаза малая субъединица (ЕС 4.1.1.39)	rbcS
WP_045586150	Рибулозо- 1,5-бисфосфаткарбоксилаза IV типа	
WP_045583407	Предполагаемый RuBisCo-экспрессирующий белок CbbX	cbbX
WP_045580455	Фруктозо-1,6-бисфосфатаза, тип I (ЕС 3.1.3.11)	fbp
WP_045583125	Фосфорибулокиназа (ЕС 2.7.1.19)	prkB
Окисление метанола		
WP_045582812	Метанолдегидрогеназа большая субъединица	mxaF
WP_045583307	Метанолдегидрогеназа малая субъединица (ЕС 1.1.99.8)	mxaI
WP_052710069	МхаА белок	mxaA
WP_045582808	МхаС, белок вовлекаемый во встраивание Са <sup>2+</sup> в метанолдегидрогеназу	mxaC
WP_045583304	МхаК белок	mxaK

WP_045582807	MxaL белок	mxaL
WP_045582810	Цитохром с-L предшественник	mxaG
WP_045583306	Регуляторный белок MoxR метанол дегидрогеназы	mxaR
WP_052710070	Гипотетический белок MxaS	mxaS
WP_045585862	Метанолдегидрогеназа большая субъединица (ЕС 1.1.99.8)	xoxF
WP_045582813	ответственный регулятор, вовлекаемый в регуляцию окисления	mxaB
	метанола	
WP_052710144	mxaJ белок	mxaJ
WP_052710068	mxaD белок	mxaD
WP_045584569	PQQ-зависимая дегидрогеназа семейства метанол/этанол	mdh2
Тетраги	дрометаноптерин (ТГМП)-зависимое окисление формальдегида	l
WP_045586015	Формальдегид-активирующий белок	fae
WP_045585873	Метилентетрагидрометаноптериндегидрогеназа (ЕС 1.5.99.9)	mtdB
WP_045585874	N(5),N(10)- метенилтетрагидрометаноптерин циклогидролаза	mch
	(EC 3.5.4.27)	
WP_045586017	Формилметанофуран-тетрагидрометаноптерин	fhcD
	Nформилтрансфераза (ЕС 2.3.1.101)	
WP_045585870	Формилметанофурандегидрогеназа субъединица А (ЕС 1.2.99.5)	fhcA
WP_045585871	Формилметанофурандегидрогеназа субъединица В (ЕС 1.2.99.5)	fhcB
WP_052710460	Формилметанофурандегидрогеназа субъединица С (ЕС 1.2.99.5)	fhcC
WP_052710474	бета-рибофуранозиламинобензен 5'-фосфат синтаза (ЕС 2.4.2.54)	mptG
	Формиат дегидрогеназа	
WP_045585716	NAD-зависимая формиатдегидрогеназа субъединица дельта	fdsD
WP_045585719	NAD-зависимая формиатдегидрогеназа субъединица гамма	fdsG
WP_045585717	NAD-зависимая формиатдегидрогеназа субъединица альфа	fdsA
WP_045585718	NAD-зависимая формиатдегидрогеназа субъединица бета	fdsB
WP_045581926	NAD-связывающая формиатдегидрогеназа, субъединица D	fdhD
WP_045585996	(EC 1.2.1.2)	
WP_045585975		
WP_045581929	NAD-связывающая формиатдегидрогеназа, субъединица А	fdhA
WP_045585998	(EC 1.2.1.2)	
WP_045583623		
	Мультиферментный Sox-комплекс	
WP_045585671	Сероокисляющий цитохром с-типа SoxA	soxA
WP_045585672	Сероокисляющий цитохром с-типа SoxX	soxX
WP_045585669	Тиосульфат-окисляющий белок-преносчик Sox Y	soxY
WP_045585670	Тиосульфат-окисляющий белок-преносчик SoxZ	soxZ
WP_045585673	Тиосульфогидролаза SoxB	soxB
WP_045585667	Сульфит дегидрогеназа (Сероокисляющий молибдобелок С)	soxC
WP_045585668	Сульфит дегидрогеназа цитохромная субъединица SoxD	soxD
Тиосульфат дегидрогеназа		
WP_052710250	Тиосульфатдегидрогеназа (белок из семейства цитохромов с)	tsd
Гидрогеназы		
WP_045583366	Гидрогеназа 1, малая субъединица	hyaA
WP_045583014	Гидрогеназа 2, большая субъединица	hyaB
WP_052710101	Ni/Fe-гидрогеназа, цитохромная субъединица b-типа	hyaCb

WP_045583011	Гидрогеназный никель-связывающий белок НурА	hypA
WP_045585791		
WP_045583950	Гидрогеназный вспомагательный белок НурВ	hypB
WP_045585790	Гидрогеназный белок-сборщик НурС	hypC
WP_045580571	Гидрогеназо-образующий белок НурD	hypD
WP_045583579	Гидрогеназо-экспрессирующий белок НурЕ	hypE
	Дыхательная электрон-транспортная цепь	
	Комплекс 1 NADH-дегидрогеназа	
WP_045580751	NADH-убихиноноксидоредуктаза субъединица А (ЕС 1.6.5.3)	nuoA
WP_045580750	NADH-убихиноноксидоредуктаза субъединица В (ЕС 1.6.5.3)	nouB
WP_045580749	NADH-убихиноноксидоредуктаза субъединица С (ЕС 1.6.5.3)	nuoC
WP_045582388	NADH-убихиноноксидоредуктаза субъединица D (ЕС 1.6.5.3)	nuoD
WP_045580748	NADH-убихиноноксидоредуктаза субъединица Е (ЕС 1.6.5.3)	nuoE
WP_045580747	NADH-убихиноноксидоредуктаза субъединица F (EC 1.6.5.3)	nuoF
WP_045580746	NADH-убихиноноксидоредуктаза субъединица G (EC 1.6.5.3)	nuoG
WP_045580745	NADH-убихиноноксидоредуктаза субъединица Н (ЕС 1.6.5.3)	nuoH
WP_045582387.	NADH-убихиноноксидоредуктаза субъединица I (ЕС 1.6.5.3)	nuoI
1		
WP_045580744	NADH-убихиноноксидоредуктаза субъединица J (ЕС 1.6.5.3)	nuoJ
WP_045580743	NADH-убихиноноксидоредуктаза субъединица К (ЕС 1.6.5.3)	nuoK
WP_045580742	NADH-убихиноноксидоредуктаза субъединица L (EC 1.6.5.3)	nuoL
WP_045580741	NADH-убихиноноксидоредуктаза субъединица М (ЕС 1.6.5.3)	пиоМ
WP_045580740	NADH-убихиноноксидоредуктаза субъединица N (ЕС 1.6.5.3)	nuoN
WP_045582225	NADH-дегидрогеназа (убихинон) Fe-S белок 4	nduFS4
	Комплекс II (сукцинат дегидрогеназа)	
WP_045581435	Сукцинатдегидрогеназа цитохром b-556 субъединица	sdhC
WP_045581432	Сукцинатдегидрогеназа железо-серный белок (ЕС 1.3.99.1)	sdhB
WP_045581433	Сукцинатдегидрогеназа флавопротеиновая субъединица (ЕС 1.3.99.1)	sdhA
WP_045581434	Сукцинатдегидрогеназа гидрофобный мембран-связывающий	sdhD
	Комплекс Ш	
WP 0/15586128		rin1
WI_043300120	(ЕС 1.10.2.2)	(ISP)
WP 045586129	Убихинол-цитохром с редуктаза цитохром в субъединица	cytB
WP 045586130	Убихинол-цитохром с редуктаза цитохром с1 субъединица	cyc1
Комплекс IV (терминальные оксилазы)		
WP 045581156	Цитохром с оксидаза cbb3-типа субъединица I (ЕС 1.9.3.1)	ccoN
WP_045584289		
WP_045581155	Цитохром с оксидаза cbb3-типа субъединица II	ccoO
WP_045584290		
WP_045581153	Цитохром с оксидаза cbb3-типа субъединица III	ccoP
WP_045580252	Тип cbb3 цитохром оксидазы биогенный белок СсоG, вовлеченный	ccoG
WP_045582867	в окисление меди	(FixG)
WP_045585070		

WD 045582000	$H_{\text{HTOYPON}}$ a available average $1 (\text{FC} \mid 0.2 \mid)$	corl
WP_045581722	цитохром с оксидаза субъединица т (ЕС 1.9.5.1)	COXI
WP_045582100		
WF_045382100		2
WP_045582672	Цитохром с оксидаза субъединица 3	cox3
WP_045582586	Цитохром с оксидаза субъединица II (ЕС 1.9.3.1)	cox2
WP_045582098		
WP_045581723	Цитохром с оксидаза субъединица II / Цитохром с оксидаза	cox2/cox
	субъединица III	3
WP_045582764	Цитохром d убихинол оксидаза субъединица I (ЕС 1.10.3)	cydA
WP_045582763	Цитохром d убихинол оксидаза субъединица II (ЕС 1.10.3)	cydB
WP_052710213	Транспортный ATP-связывающий белок CydCD	cydCD
WP_045586276	Возможный цитохром bd2, субъединица I	qxtI
WP_045586141	Возможный цитохром bd2, субъединица II	qxtII
WP_045584743	Цитохром о убихинол оксидаза субъединица II (ЕС 1.10.3)	суоА
WP_045584742	Цитохром о убихинол оксидаза субъединица I (ЕС 1.10.3)	суоВ
WP_045585215	Цитохром о убихинол оксидаза субъединица III (ЕС 1.10.3)	cyoC
WP_045584741	Цитохром о убихинол оксидаза субъединица IV (ЕС 1.10.3)	cyoD
	АТФаза	
WP 045581938	H+-транспортирующая АТФаза субъединица а F-типа	atpB
WP 052709988	Н+-транспортирующая АТФаза субъединица b F-типа	atpF
WP_045581937	АТФ-синтаза сектор F0 субъединица с	atnE
WP_045581030	Н+-транспортирующая АТФаза субъединица альфа Е-типа	atp2
	(EC 3.6.3.14)	upn
WP_045581028	Н+-транспортирующая АТФаза субъединица бета F-типа (ЕС 3.6.3.14)	atpD
WP_045581031	H+-транспортирующая АТФаза субъединица дельта F-типа	atpH
WP_045581027	H+-транспортирующая АТФаза субъединица эпсилон F-типа	atpC
WP_045581029	Н+-транспортирующая АТФаза субъединица гамма F-типа	atpG
	Переносчики фосфата	
WP_045581495	Неорганическая пирофосфатаза (ЕС 3.6.1.1)	рра
WP_045580125	Полифосфаткиназа (ЕС 2.7.4.1)	ppk
	Тетратионат редуктаза	
WP 045584297	Тетратионатредуктаза A (ЕС 1.8.99.В2)	ttrA
WP 045584295	Тетратионатредуктаза В (ЕС 1.8.99.В2)	<i>ttrB</i>
 WP_045584296	Тетратионатрелуктаза С (ЕС 1.8.99.В2)	ttrC
WP 045583026	Релуктаза окиси азота субъелиница С (ЕС 1.7.99.7)	norC
WP_045583025	Релуктаза окиси азота субъединица В (ЕС 1 7 99 7)	norB
WP_045583023	Белок активирующий релуктазу окиси азота NorD	norD
WP_045583027	Белок, активирующий редуктазу окиси азота NorE	norF
WP 04558302/	Белок, активирующий релуктазу окиси азота Nor	norO
		11012
WP 045580816	¥ทั่งเลยุที่มีนั้น Нитрогенарш เข้ (молибло-уелерн เข้) อาอาเมล์บและชนข้	nifA
¥¥1_043360610	транскрипционный регулятор NifA	тул
WP_045582617	Цистеин десульфураза (EC 2.8.1.7), NifS подсемейство	nifS
WP_045581871	Железо-серный кластер белков-сборщиков NifU	nifU
		v

WP_045582404	Нитрогеназный FeMo-кофактор синтеза FeS ядра и сборки белка NifB	nifB
	NIB	
WP_045581955	4Fe-4S ферредоксин, нитрогеназо-связанный	frdN
WP_014248512		
WP_045581958	Нитрогеназный FeMo-кофактор белка-переносчика NifX	nifX
WP_045581957	NifX-связанный белок	nifX2
WP_045581959	Нитрогеназный FeMo-кофактор и сборщик белка NifN	nifN
WP_045581960	Нитрогеназный FeMo-кофактор и сборщик белка NifE	nifE
WP_045582331	Нитрогеназный FeMo-кофактор синтеза белка доставки молибдена	nifQ
	NifQ	
WP_045581870	Гомоцитрат синтаза (ЕС 2.3.3.14)	nifV
WP_045581869	Нитрогеназостабилизирующий/защищающий белок NifW	nifW
WP_045581965	Нитрогеназо(молибдо-железо)редуктаза и белок созревания NifH	nifH
WP_045581964	Нитрогеназа(молибдо-железо) альфа субъединица (ЕС 1.18.6.1)	nifD
WP_045581963	Нитрогеназа(молибдо-железо) бета субъединица (ЕС 1.18.6.1)	nifK
WP_045580821	NifZ белок	nifZ
WP_045580820		
WP_045580823	NifT белок	nifT
WP_045580206	Нитрогеназо-связанный белок NifO	nifO
WP_045581968		
WP_045580819	LRV (FeS)4 кластер доменный белок кластеризованный с	avin2460
	нитрогеназным кофактором синтеза	