
**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ**

КАРБОАНГИДРАЗА АНОКСИГЕННЫХ ФОТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ© 2020 г. Р. Н. Ивановский^{а, *}, О. И. Кеппен^а, Н. В. Лебедева^а, Д. С. Груздев^б^аКафедра микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119192 Россия^бФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН,
лаборатория молекулярной диагностики, Москва, 119071 Россия

*e-mail: mguru@mail.ru

Поступила в редакцию 09.07.2019 г.

После доработки 27.10.2019 г.

Принята к публикации 01.11.2019 г.

Гены карбоангидразы (КА) обнаружены у всех аноксигенных пурпурных бактерий. Несерные пурпурные бактерии, принадлежащие к α протеобактериям: *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodospirillum fulvum*, *Rhodoblastus acidophilus* и *Rhodopseudomonas palustris* содержали гены α - и β -КА. α -Протеобактерии *Rhodomicrobium vannielii*, *Blastochloris viridis*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter veldkampii*, *Rhodovulum euryhalinum*, *Rhodovulum sulfidophilum* обладали только генами β -КА. Несерные пурпурные бактерии, относящиеся к β протеобактериям *Rubrivivax gelatinosus*, и пурпурные серные бактерии, относящиеся к γ -протеобактериям, содержали гены α - и β -КА. Зеленые серные бактерии *Chlorobaculum limnaeum* и *Chlorobaculum parvum* и зеленые несерные нитчатые бактерии *Chloroflexus aurantiacus* не содержали генов КА. Однако у *Oscillochloris trichoides*, принадлежащий к той же таксономической группе, обнаружен ген β -КА. γ -КА в геномах исследованных в данной работе фототрофных бактерий не обнаружена. Несмотря на наличие генов КА, у всех пурпурных бактерий активность α - и β -КА была выявлена только у 4 видов пурпурных несерных, относящихся к α -протеобактериям: *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodoblastus acidophilus* и *Rhodospirillum fulvum*. Эти бактерии способны синтезировать КА как в фотоавтотрофных, так и в фотогетеротрофных условиях роста на средах с ацетатом, малатом или фруктозой. Кроме того, эти бактерии (за исключением *Rhodospirillum fulvum*, не способной расти в аэробных условиях) обладают КА-активностью и при росте в темноте в аэробных условиях.

Ключевые слова: карбоангидраза, аноксигенные фототрофные бактерии**DOI:** 10.31857/S0026365620020068

В метаболизме бактерий имеется значительное число реакций, субстратом которых являются CO_2 или HCO_3^- . При этом различные пути автотрофной ассимиляции в качестве субстрата в реакциях карбоксилирования используют различные формы неорганического углерода (табл. 1). Концентрация углекислого газа в современной атмосфере составляет 0.04%, что соответствует 12 мкМ для CO_2 и 120 мкМ для HCO_3^- , растворенных в воде (DiMario, 2018). Это ниже величины K_m для большинства ферментов, использующих CO_2 и/или HCO_3^- , осуществляющих реакцию карбоксилирования, таких как рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза (РБК), пируваткарбоксилаза, ацетил-КоА-карбоксилаза, фосфоенолпируваткарбоксилаза, пируват- и 3-оксоглутаратсинтаза (Furdui, Ragsdale, 2000; DiMario, 2018). Кроме того, карбоксилазы, использующие CO_2 в качестве субстрата, имеют низкое сродство к CO_2 (K_m) и низкую каталитическую активность. K_{cat}

(число оборотов) для различных форм РБК колеблется в пределах от 4 до 11 s^{-1} , а у пируватсинтазы *Clostridium thermoaceticum* равна 3.2 s^{-1} и $K_m = 2$ мМ (Furdui, Ragsdale, 2000; Badger, Bek, 2008).

Для поддержания максимальной скорости функционирования карбоксилирующих ферментов необходимо восполнять концентрацию $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$, расходуемых в реакциях карбоксилирования. Эту функцию выполняет карбоангидраза (КА) (ЕС 4.2.1.1). Необходимость этого обусловлена тем, что спонтанная обратимая гидратация углекислоты $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ — медленный процесс с $K_{\text{cat}} = 15$ и 50 s^{-1} в прямом и обратном направлении соответственно. Карбоангидраза ускоряет эту реакцию на 4–6 порядков ($K_{\text{cat}} = 10^4$ – 10^6 s^{-1}) (Supuran, Capasso, 2017).

Гены КА обнаружены у представителей всех трех таксономических доменов: архей, бактерий и эукариот (Capasso, Supuran, 2015). Исключение составляют эндосимбионты или бактерии, расту-

Таблица 1. Форма неорганического углерода ($\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$), используемая в качестве субстрата различными карбоксилазами у фототрофных бактерий

Путь автотрофной фиксации углерода	Фермент	Форма неорганического углерода
Восстановительный пентозофосфатный цикл (цикл Кальвина)	Рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилаза/оксигеназа	CO_2
Восстановительный цикл трикарбоновых кислот	Изоцитратдегидрогеназа	CO_2
	Пируватсинтаза	CO_2
	2-Оксоглутаратсинтаза	CO_2
	Фосфоенолпируваткарбоксилаза	HCO_3^-
3-Гидроксипропионатный цикл	Ацетил-КоА-карбоксилаза	HCO_3^-
	Пропионил-КоА-карбоксилаза	HCO_3^-

щие при высоком (1–5%) содержании CO_2 в окружающей среде. Предполагается, что эти бактерии утратили КА в процессе адаптации к таким условиям (Ueda et al., 2012). Карбоангидразы бактерий принадлежат к трем генетически различным группам: α - β - и γ -КА. В их каталитическом центре содержатся ион Zn^{2+} . α -КА локализована в периплазматическом пространстве и встречается только у грамотрицательных бактерий (Supuran, Capasso, 2017). β - и γ -КА имеют цитоплазматическую локализацию (Gai et al., 2014; Capasso, Supuran, 2015). КА является также обязательным компонентом карбоксисом цианобактерий и хемолитоавтотрофных бактерий (Sawaya et al., 2006; Rae et al., 2013).

Исследование КА фототрофных организмов ограничено в основном высшими растениями, водорослями и цианобактериями (DiMario, 2018). КА фототрофных бактерий исследованы в значительно меньшей степени. Наличие карбоангидразной активности показано для двух видов: *Rhodospirillum rubrum* (Gill et al., 1984) и *Rhodospseudomonas palustris* (Puskas et al., 2000). КА обеих бактерий были очищены до гомогенного состояния, имели молекулярную массу 28 и 27 кДа соответственно и относились к КА α -типа. Локализация и функция КА исследованы только для *Rps. palustris*. КА *Rps. palustris* локализована в периплазматическом пространстве, и, по-видимому, ее основной функцией является участие в системе транспорта неорганического углерода в клетки бактерии, восполняя его убыль в периплазме в результате функционирования внутриклеточных реакций карбоксилирования. В пользу этого свидетельствует торможение роста *R. palustris* при добавлении ацетазоламида — ингибитора КА, и медленный рост мутантов, лишенных α -КА. Добавление высоких концентраций бикарбоната или CO_2 восстанавливает скорость роста *R. palustris* (Puskas et al., 2000).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были 23 штамма фототрофных бактерий из коллекции кафедры микробиологии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Бактерии *Rhodospirillum rubrum*, *Phaeospirillum fulvum*, *Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodomicrobium vannielii*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Blastochloris viridis* выращивали на среде Ормерода (Ormerod et al., 1961); *Rhodoblastus acidophilus*, *Rhodovulum euryhalinum*, *Rubrivivax gelatinosus*, *Rhodocyclus tenuis*, *Rhodocyclus purpureus*, *Allochro-matium vinosum*, *Thiocapsa roseopersicina* на среде Пфеннига (Schlegel, Pfennig, 1961); *Chlorobaculum limnaeum* на среде Ларсена (Larsen, 1952), *Chloroflexus aurantiacus* j-10-f1 и *Oscillochloris trichoides* DG-6 — на среде Кастенхольца (Castenholz, Pierson, 1981). В фотоавтотрофных условиях выращивание бактерий проводили в 500-мл флаконах с резиновой пробкой с 200 мл среды. Оставшийся объем заполняли молекулярным водородом. В фотогетеротрофных условиях бактерии выращивали во флаконах объемом 250 мл. Интенсивность света для фототрофного роста составляла 10000 лк. В темноте в аэробных условиях культуры выращивали на роторном шейкере в колбах объемом 750 мл с 250 мл среды. При выращивании клеток в качестве источника углерода использовали бикарбонат (0.1%) и органические субстраты: ацетат, малат или фруктозу (0.2%).

В опытах использовали клетки из культур, находящихся в середине линейной фазы роста. Клетки отделяли от среды центрифугированием при 8000 g и суспендировали в 30 мМ фосфатном буфере (pH 8.0). Для определения активности β -КА бактерии разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2М при 22 кГц. Все операции проводили при 0–4°C.

Активность карбоангидразы измеряли по скорости выделения H^+ в результате гидратации CO_2

при 4°C. Для этого клеточную суспензию или бесклеточный экстракт, содержащие 0.05–2.0 мг белка, добавляли в охлажденный до 4°C реакционный сосуд, содержащий 14 мл К-фосфатного буфера (10 мМ, pH 8.0). Реакцию начинали добавлением 1 мл охлажденной до 4°C дистиллированной воды, насыщенной CO₂. Измерения проводили, используя pH-метр Аквилон pH-410 (Россия), с регистрацией кинетики подкисления среды в диапазоне pH от 8.0 до 7.0. Активность карбоангидразы рассчитывали по уравнению $U = (T_0 - T) / T \text{ мг}^{-1} \text{ белка}$, где T — время изменения pH от 8.0 до 7.0 в отсутствии испытуемого образца, T_0 — в присутствии суспензии клеток или бесклеточного экстракта. Активности β-КА определяли по увеличению карбоангидразной активности в разрушенных клетках по сравнению с неразрушенными на величину, превышающую точность измерения активности КА (более 0.2). Белок определяли по Лоури.

Поиск генов КА в геномах аноксигенных фототрофных бактерий проводили с использованием сервиса BlastKoala (Kanehisa et al., 2016) и BLASTp поиска (E-value < 1e-20) (Altschul et al., 1990) в базе данных NCBI. Тип идентифицированных КА определяли по результатам филогенетического анализа с известными последовательностями α-, β- и γ-КА. Для этого аминокислотные последовательности КА выравнивали с использованием MAFFT (Katoh et al., 2002) и проводили реконструкцию филогенетического дерева с применением алгоритма neighbour-joining, реализованного в MEGA7 (Kumar et al., 2016). Достоверность ветвления проверена с помощью “bootstrap”-анализа 5000 альтернативных деревьев.

У штаммов, для которых полногеномный си-квенс отсутствует (отмечены знаком “*”), тип и количество генов карбоангидраз (табл. 2) приведены для генома штамма того же вида, геном которого имеется в соответствующей базе данных (см. рис. 1). Наш биоинформационный анализ показал (данные не показаны), что если штаммы данного вида корректно определены, как принадлежащие к данному виду то тип и количество генов карбоангидраз у них не только совпадает, но и локализованы они внутри одного и того же кластера генов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распространение карбоангидразы. Гены КА обнаружены у всех аноксигенных пурпурных бактерий (рис. 1, табл. 2). Несерные пурпурные бактерии, принадлежащие к α-протеобактериям (*Rsp. rubrum*, *Phs. fulvum*, *Rbl. acidophilus* и *Rps. palustris*), содержали гены α- и β-КА. α-Протеобактерии *Rmi. vanniellii*, *Blc. viridis*, *Rba. sphaeroides*, *Rba. capsulatus*, *Rba. veldkampii*, *Rvu. euryhalinum*, *Rvu. sulfi-*

dophilum обладали только генами β-КА. Несерные пурпурные бактерии *Rubrivivax gelatinosus*, относящиеся к β-протеобактериям, и пурпурные серные бактерии *Allochrochromatium vinosum* и *Thiocapsa roseopersicina* (γ-протеобактерии) содержали гены α- и β-КА. Несмотря на то, что у зеленых серных бактерий в реакциях карбоксилирования в восстановительном цикле трикарбоновых кислот используется CO₂, у *Cba. limnaeum* и *Cba. parvum* гены КА отсутствуют. Причиной отсутствия КА у этих бактерий могут быть их физиологические особенности. Зеленые серные бактерии — строгие фотоавтотрофы, растущие в условиях высокого содержания сульфида, используя его в качестве основного донора электронов для фиксации CO₂ (Frigaard, Dahl, 2009; Dahl, 2017). Сульфид является сильным ингибитором КА (Davis, 1959), что, возможно, и является причиной отсутствия КА у этих бактерий. Пурпурные серные бактерии *Allochrochromatium vinosum* и *Thiocapsa roseopersicina* (γ-протеобактерии) содержали гены α- и β-КА. Геномы зеленых несерных нитчатых бактерий семейства *Chloroflexaceae* — *Cfl. aurantiacus*, *Cfl. aggregans* и *Cfl. islandicus*, не содержали генов КА. Однако представитель семейства *Oscillochloridaceae* *Osc. trichoides*, принадлежащий к той же таксономической группе (порядок *Chloroflexales*), что и *Cfl. aurantiacus*, содержит ген β-КА. γ-КА в геномах исследованных в данной работе аноксигенных фототрофных бактерий не обнаружена.

Активность и локализация КА. О наличии и локализации КА судили по величине ее активности в целых и разрушенных ультразвуком клеток. При этом мы исходили из предположения, что КА, измеряемая с использованием целых клеток, отражает активность α-КА, локализованной в периплазме клеток. При этом β-КА, локализованная в цитоплазме, недоступна для измерения используемым методом. Она становится доступной для измерения после разрушения клеток ультразвуком. По увеличению активности КА в разрушенных клетках судили о наличии и активности β-КА. Несмотря на наличие генов КА у всех пурпурных бактерий, активность β-КА была выявлена только у пурпурных несерных, относящихся к α-протеобактериям и обладающим α-КА: *Rsp. rubrum*, *Rps. palustris*, *Rbl. acidophilus* и *Phs. fulvum*. Судя по увеличению активности КА ($\Delta U = U \text{ КА разрушенных клеток} - U \text{ целых клеток}$) после разрушения клеток, эти бактерии обладают также и активностью β-КА. Величина активности β-КА ниже, чем α-КА, и в зависимости от условий выращивания колеблется у разных бактерий в пределах от 0.1 до 8 U/мг белка (табл. 3).

У α-протеобактерий, не содержащих генов α-КА, но обладающих генами β-КА, — *Rba. sphaeroides*, *Rba. capsulatus*, *Rba. veldkampii*, *Rvu. euryhalinum*, *Rvu. sulfidophilum* и *Blc. viridis*, карбоанги-

Таблица 2. Карбоангидраза аноксигенных фототрофных бактерий

Бактерии (штамм)	Тип КА	Активность
Несерные пурпурные бактерии (α -протеобактерии)		
<i>Rhodospirillum rubrum</i> KM МГУ 301*	α , β	7.9
<i>Rhodospirillum fulvum</i> KM МГУ 325	α , 2 β	37.8
<i>Rhodoblastus acidophilus</i> KM МГУ 287*	α , β	23.0
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> KM МГУ 285*	α , 3 β	32.5
KM МГУ 286*		26.0
KM МГУ 287*		27.0
<i>Rhodomicrobium vannielii</i> KM МГУ 305*	2 β	<0.1
<i>Blastochloris viridis</i>	β	<0.1
KM МГУ 290*		<0.1
KM МГУ 289*		<0.1
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> KM МГУ 323*	β	<0.1
KM МГУ 294*		<0.1
KM МГУ 295*		<0.1
<i>Rhodobacter capsulatus</i> B10	β	<0.1
KM МГУ 298*		<0.1
KM МГУ 238*		<0.1
<i>Rhodovulum euryhalinum</i> DSMZ 4868	β	<0.1
<i>Rhodovulum sulfidophilum</i> DSMZ 1374	β	<0.1
<i>Rhodobacter veldkampii</i> KM МГУ 317*	2 β	<0.1
Несерные пурпурные бактерии (β -протеобактерии)		
<i>Rubrivivax gelatinosus</i> DSM 149	α , β	<0.1
Пурпурные серные бактерии (γ -протеобактерии)		
<i>Allochromatium vinosum</i> KM МГУ 307*	α , β	<0.1
<i>Thiocapsa roseopersicina</i> DSM 217	2 α , 3 β	<0.1
Зеленые серные бактерии		
<i>Chlorobaculum limnaeum</i> KM МГУ 319*	Нет	<0.1
<i>Chlorobaculum parvum</i> KM МГУ 321*	Нет	<0.1
Зеленые несерные нитчатые бактерии		
<i>Chloroflexus aurantiacus</i> OK-70-fl	Нет	<0.1
<i>Oscillochloris trichoides</i> DG-6	β	<0.1

Примечание. У штаммов, отмеченных знаком "*", для которых полногеномный сиквенс отсутствует, тип и количество генов карбоангидраз приведены для генома штамма того же вида, сиквенс генома которого имеется в соответствующей базе данных (см. рис. 1).

дразной активности ни в целых, ни в препаратах разрушенных клеток не обнаружено (табл. 2). Причиной этого может быть либо отсутствие экспрессии гена β -КА у этих бактерий, либо активность этих КА ниже чувствительности метода (<0.1), используемого для определения карбоангидразной активности. У серных пурпурных бактерий, относящихся к γ -протеобактериям (*Alc. vinosum* и *Tca. roseopersicina*), несмотря на наличие в

их геномах генов α - и β -КА, карбоксилазной активности не выявлено (табл. 1) даже при выращивании их в фотоавтотрофных условиях на среде с водородом в качестве донора электронов.

Регуляция синтеза КА. *Rsp. rubrum*, *Rps. palustris*, *Rbl. acidophilus*, *Phs. fulvum* и *Rmi. vannielii* синтезируют α -КА независимо условий выращивания и используемого источника углерода (табл. 3). Однако у *Phs. fulvum*, *Rps. palustris* и *Rmi. vannielii* на-

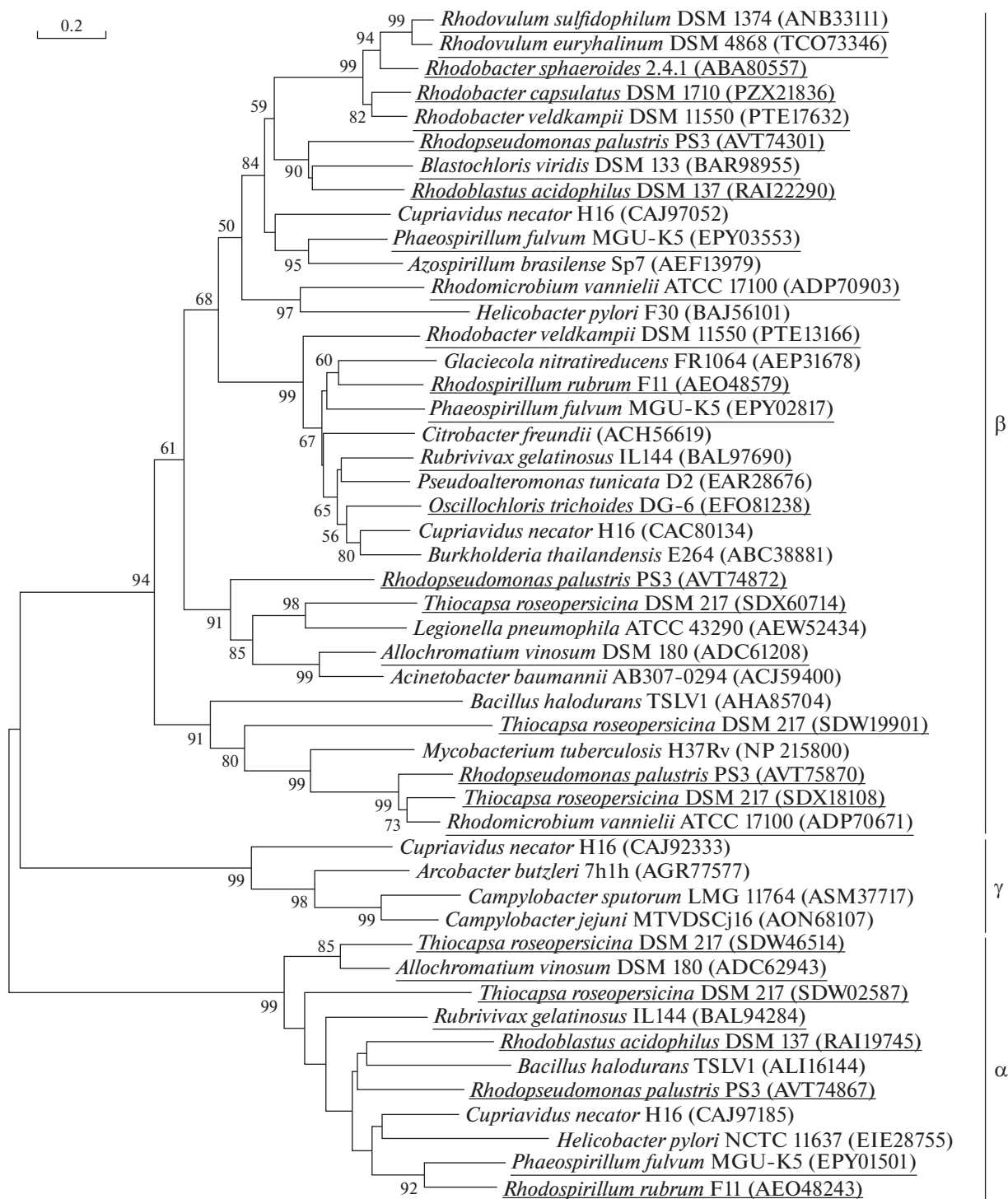


Рис. 1. Филогенетическое дерево, основанное на анализе аминокислотных последовательностей КА. Дерево построено с использованием алгоритма neighbor-joining. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 0.2 замены на аминокислотную позицию. Цифрами показана достоверность ветвления на основании "bootstrap"-анализа 5000 альтернативных деревьев (показаны значения >50%). Последовательности КА аноксигенных фототрофных бактерий выделены подчеркиванием.

блюдалось значительное (в 5–10 раз) увеличение активности карбоангидразы при росте культур в фотоавтотрофных условиях с использованием в

качестве донора электронов молекулярного водорода. Это указывает на участие карбоангидразы в процессе транспорта неорганического углерода

Таблица 3. Активность карбоангидразы у аноксигенных пурпурных несерных бактерий, выросших в разных условиях (активность выражена в U)

Бактерии	Малат		Ацетат		Фруктоза		CO ₂ (H ₂)		Малат*	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<i>Rsp. rubrum</i>	2.6	3.7	3.2	3.8	3.4	4.0	6.0	7.9	14.5	14.9
ΔU	1.1		0.6		0.6		1.9		0.4	
<i>Rps. palustris</i>	7.5	12.7	5.5	5.5	4.2	4.2	31.0	32.5	5.8	6.4
ΔU	5.2		0.0		0.0		0.1		0.6	
<i>Rbl. acidophilus</i>	38.0	43.0	27.0	35.0	34.0	33.9	21.0	23.0	7.0	7.1
ΔU	5.0		8.0		0.0		2.0		0.1	
<i>Phs. fulvum</i>	3.6	3.5	10.0	10.0	2.1	2.1	34.5	37.8	#	#
ΔU	0.1		0.0		0.0		3.3		#	

Примечание. 1 — целые клетки; 2 — разрушенные клетки. ΔU = U разрушенных клеток — U целых клеток; “*” — культуры выращивали в аэробных условиях в темноте; “#” — не растет в аэробных условиях.

(CO₂/HCO₃[−]) в клетки бактерий. У *Rsp. rubrum* значительного увеличения синтеза КА не происходит (табл. 2). Проблема эффективности функционирования цикла Кальвина в условиях дефицита углекислоты у *Rsp. rubrum* в фотоавтотрофных условиях решается, видимо, не за счет ускорения ее транспорта в клетки, а в результате десятикратного увеличения уровня синтеза РБК. В этих условиях содержание РБК составляет почти 50% от растворимых белков в клетках *Rsp. rubrum* (Sarles, Tabita, 1983; Leustek et al., 1988). У *Rbl. acidophilus* увеличения карбоангидразной активности при росте в фотоавтотрофных условиях не обнаружено. Высокий уровень конститутивного синтеза карбоангидразы *Rbl. acidophilus*, по-видимому, связан с особенностями физиологии этой бактерии. В отличие от большинства пурпурных несерных бактерий, для которых рН оптимум роста близок к 7.0, оптимум рН для роста *Rbl. acidophilus* равен 5.8 (Imhoff, 2001). При этом значении рН основная часть углекислоты в среде (более 90%) находится в форме CO₂. Активный транспорт неорганического углерода через цитоплазматическую мембрану осуществляется в форме HCO₃[−] (Price et al., 2008; Burnap et al., 2015), что предполагает наличие высокой активности периплазматической α-КА для эффективной конверсии CO₂ в HCO₃[−]. У всех пурпурных бактерий, способных к синтезу карбоангидразы, она обнаружена не только у клеток, выросших на свету, но и в аэробных условиях в темноте, когда синтез ключевых ферментов цикла Кальвина репрессирован (Romagnoli, Tabita, 2009). В этих условиях КА обеспечивает функционирование карбоксилаз, участвующих в метаболизме органических соединений, используемых в качестве субстратов в темноте в аэробных условиях.

Характерной кинетической особенностью РБК — ключевого фермента цикла Кальвина и пируватсинтазы в восстановительном цикле трикарбоновых кислот является их низкая величина сродства к CO₂ (K_m) и каталитической эффективности (k_{cat}) (Furdui, Ragsdale, 2000; Badger, Bek, 2008). Поэтому для увеличения скорости и эффективности функционирования карбоксилаз необходимо поддерживать высокую (выше K_m) концентрацию CO₂ вблизи их реакционных центров. Эту функцию у оксигенных и аноксигенных фототрофов выполняет CO₂-концентрирующий механизм, в котором КА является обязательным компонентом (DiMario, 2018). Можно предположить, что наличие периплазматической α-КА обязательно для планктонных форм аноксигенных фототрофов в водных экосистемах с низким содержанием CO₂. У аноксигенных фототрофов, растущих в составе цианобактериальных матов совместно с гетеротрофными микроорганизмами, продуцирующими значительные количества CO₂, необходимость в периплазматической КА (α-КА) может отсутствовать. Однако при этом сохраняется необходимость увеличения внутриклеточной концентрации CO₂ вблизи реакционного центра РБК. Эту функцию выполняет β-КА.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. 1990. V. 215. P. 403–410.
- Badger M.R., Bek E.J. Multiple Rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO₂ acquisition by the CBB cycle // J. Exp. Bot. 2008. V. 59. P. 1525–1541.
- Burnap R.L., Hagemann M., Kaplan A. Regulation of CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria // Life (Basel). 2015. V. 5. P. 348–371.
- Capasso C., Supuran C.T. An overview of the alpha-, beta- and gamma-carbonic anhydrases from Bacteria: can bacterial carbonic anhydrases shed new light on evolution of bacteria? // J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2015. V. 30. P. 325–332.
- Castenholz R.W., Pierson B.K. Isolation of members of the family *Chloroflexaceae* // The Prokaryotes / Eds. Staarr M.P., Truper H.G., Ballows A., Schlegel H.G. Berlin: Springer Verlag, 1981. V. 1. P. 290–298.
- Dahl C. Sulfur metabolism in phototrophic bacteria // Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes. Metabolism, Bioenergetics and Omics / Eds. Hallenbeck P. Springer, 2017. P. 27–66.
- Davis R.P. The kinetics of the reaction of human erythrocyte carbonic anhydrase. II. The effect of sulfanilamide, sodium sulfide and various chelating agents // J. Amer. Chem. Soc. 1959. V. 81. P. 5674–5678.
- DiMario R.J., Machingura M.C., Waldrop G.L., Moroney J.V. The many types of carbonic anhydrases in photosynthetic organisms. // Plant Sci. 2018. V. 268. P. 11–17.
- Frigaard N.U., Dahl C. Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria // Adv. Microb. Physiol. 2009. V. 54. P. 103–200.
- Furdui C., Ragsdale S.W. The role of pyruvate ferredoxin oxidoreductase in pyruvate synthesis during autotrophic growth by the Wood-Ljungdahl pathway // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 28494–28499.
- Gai C.S., Lu J., Brigham C.J., Bernardi A.C., Sinskey A.J. Insights into bacterial CO₂ metabolism revealed by the characterization of four carbonic anhydrases in *Ralstonia eutropha* H16 // AMB Express. 2014. V. 4. Article 2. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-4-2>
- Gill S.R., Fedorka-Cray P.J., Tweten R.K., Sleeper B.P. Purification and properties of the carbonic anhydrase of *Rhodospirillum rubrum* // Arch. Microbiol. 1984. V. 138. P. 113–118.
- Imhoff J.F. Transfer of *Rhodopseudomonas acidophila* to the new genus *Rhodoblastus* as *Rhodoblastus acidophilus* gen. nov., comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. V. 51. P. 1863–1866.
- Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences // J. Mol. Biol. 2016. V. 428. P. 726–731.
- Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform // Nucl. Acids Res. 2002. V. 30. P. 3059–3066.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- Larsen H. On the culture and general physiology of the green sulfur bacteria // J. Bacteriol. 1952. V. 64. P. 187–196.
- Leustek T., Hartwig R., Weissbach H., Brot N. Regulation of ribulose biphosphate carboxylase expression in *Rhodospirillum rubrum*: characteristics of mRNA synthesized *in vivo* and *in vitro* // J. Bacteriol. 1988. V. 170. P. 4065–4071.
- Ormerod J.G., Ormerod K.S., Gest H. Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria; relationships with nitrogen metabolism // Arch. Biochem. Biophys. 1961. V. 94. P. 449–463.
- Price G.D., Badger M.R., Woodger F.J., Long B.M. Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants // J. Exp. Bot. 2008. V. 59. P. 1441–1461.
- Puskas L.G., Inui M., Zahn K., Yukawa H. A periplasmic, alpha-type carbonic anhydrase from *Rhodopseudomonas palustris* is essential for bicarbonate uptake // Microbiology (SGM). 2000. V. 146. P. 2957–2966.
- Rae B.D., Long B.M., Badger M.R., Price G.D. Functions, compositions, and evolution of the two types of carboxysomes: polyhedral microcompartments that facilitate CO₂ fixation in Cyanobacteria and some Proteobacteria // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2013. V. 77. P. 357–379.
- Romagnoli S., Tabita F.R. Carbon dioxide metabolism and its regulation in nonsulfur purple photosynthetic bacteria // The Purple Phototrophic Bacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration / Eds. Hunter C.N., Daldal F., Thurnauer M.C., Beatty J.T. Dordrecht: Springer, 2009. V. 28. P. 563–576.
- Sarles L.S., Tabita F.R. Derepression of the synthesis of D-ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Rhodospirillum rubrum* // J. Bacteriol. 1983. V. 153. P. 458–464.
- Sawaya M.R., Cannon G.C., Heinhorst S., Tanaka S., Williams E.B., Yeates T.O., Kerfeld C.A. The structure of beta-carbonic anhydrase from the carboxysomal shell reveals a distinct subclass with one active site for the price of two // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 7546–7555.
- Schlegel H.G., Pfennig N. Enriched culture for various purple sulfur bacteria // Arch. Mikrobiol. 1961. V. 38. P. 1–39.
- Supuran C.T., Capasso C. An overview of the bacterial carbonic anhydrases // Metabolites. 2017. V. 7. pii: E56. <https://doi.org/10.3390/metabo7040056>
- Ueda K., Nishida H., Beppu T. Dispensabilities of carbonic anhydrase in proteobacteria // Int. J. Evol. Biol. 2012. V. 2012. Article 324549. <https://doi.org/10.1155/2012/324549>

Carbonic Anhydrase in Anoxygenic Phototrophic Bacteria

R. N. Ivanovsky^{1,*}, O. I. Keppen¹, N. V. Lebedeva¹, and D. S. Gruzdev²

¹Department of Microbiology, Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119192 Russia

²Laboratory of Molecular Diagnostics, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: mguru@mail.ru

Received July 9, 2019; revised October 27, 2019; accepted November 1, 2019

Abstract—The genes encoding carbonic anhydrase (CA) were found in all anoxygenic purple bacteria. The genes of α - и β -CA were found in purple nonsulfur bacteria of the class *Alphaproteobacteria*: *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodospirillum fulvum*, *Rhodoblastus acidophilus*, and *Rhodopseudomonas palustris*. The alphaproteobacteria *Rhodomicrobium vannielii*, *Blastochloris viridis*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter veldkampii*, *Rhodovulum euryhalinum*, and *Rhodovulum sulfidophilum* possessed only the β -CA genes. Both nonsulfur purple bacteria of the class *Betaproteobacteria* (*Rubrivivax gelatinosus*) and purple sulfur bacteria (class *Gammaproteobacteria*) contained the α - and β -CA. No CA genes were found in green sulfur bacteria *Chlorobaculum limnaeum* and *Chlorobaculum parvum*, as well as in filamentous green nonsulfur bacteria *Chloroflexus aurantiacus*. However, the β -CA gene was revealed in *Oscillochloris trichoides*, which belonged to the latter taxonomic group. No γ -CA genes were detected in the genomes of the phototrophic bacteria studied in the present work. Although CA genes were present in all purple bacteria, the α - and β -CA activity was observed only in four species of purple nonsulfur *Alphaproteobacteria*: *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodoblastus acidophilus*, and *Rhodospirillum fulvum*. These bacteria are able to synthesize CA under both photoautotrophic and photoheterotrophic conditions in the media with acetate, malate, or fructose. These bacteria (except for *Rhodospirillum fulvum*, which is unable to grow under aerobic conditions), also exhibit CA activity when grown under aerobic conditions in the dark.

Keywords: carbonic anhydrase, anoxygenic phototrophic bacteria