

АЗОТНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ АНОКСИГЕННОЙ НИТЧАТОЙ ФОТОТРОФНОЙ БАКТЕРИИ *OSCILLOCHLORIS TRICHOIDES* DG-6¹

© 2021 г. Р. Н. Ивановский^а, * , Н. В. Лебедева^а, О. И. Кеппен^а, Т. П. Турова^б

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, 119191, Россия

^бИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия
*e-mail: mguru@mail.ru

Поступила в редакцию 21.02.2021 г.

После доработки 23.03.2021 г.

Принята к публикации 24.03.2021 г.

Источниками азота для *Oscillochloris trichoides* DG-6 – типového штамма семейства *Oscillochloridaceae*, могут служить аммоний, N₂, глутамат, а также аминокислоты аспарагин, глицин, и глутамин. Ассимиляция молекулярного азота происходит при участии нитрогеназы, структурный ген которой, *nifH*, находится в составе генного кластера, включающего также гены субъединиц нитрогеназы *nifD* и *nifK* и вспомогательный ген *nifV*. Учитывая, что *nifHBDK* кластеры аннотированы также в геномах других представителей семейства *Oscillochloridaceae*, в том числе некультивируемых и таксонов-кандидатов, можно предположить, что способность к азотфиксации является свойством, имманентным для всего этого семейства. Пути ассимиляции аммония у клеток, выросших с использованием различных источников азота, могут различаться. *Osc. trichoides* DG-6 при росте на среде с аммонием ассимилирует его при участии глутаматдегидрогеназы, которая детерминируется единственным геном. Продукт экспрессии этого гена имеет двойную специфичность и может использовать для реализации реакции как НАД, так и НАДФ. При росте *Osc. trichoides* DG-6 на среде с глутаматом в качестве единственного источника азота в клетках обнаруживаются все ферменты, необходимые для реализации ГС-ГОГАТ пути. Однако для осуществления глутаминсинтетазной реакции, участвующей в этом пути, необходим отсутствующий в среде аммоний, источником которого может служить глутаматдегидрогеназная реакция.

Ключевые слова: аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии, *Oscillochloris*, азотный метаболизм, ассимиляция N₂ и аммония

DOI: 10.31857/S0026365621040066

Все известные в настоящее время аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии (АНФБ) входят в филум *Chloroflexi*. Представители порядка *Chloroflexales* образуют монофилетическую линию, включающую семейства *Chloroflexaceae*, *Roseiflexaceae* и *Oscillochloridaceae*. АНФБ, принадлежащие этим семействам, различаются по строению фотохимического аппарата, способности к автотрофии, а также по температурным режимам роста. Кроме того, между представителями этих семейств имеются различия и в осуществлении метаболизма азота (Hanada, 2014).

У представителей семейства термофильных фототрофов *Roseiflexaceae* способность использовать молекулярный азот в качестве источника азота не показана (Thiel et al., 2017). Однако в ге-

номах *Roseiflexus* sp. RS1 и *Roseiflexus castenholzii* был обнаружен кластер из четырех совместно локализованных *nifHBDK* генов, которые, как предполагается, кодируют структурные гены Мо-нитрогеназы. При этом было высказано предположение, что неспособность к росту этих бактерий в diazotrophic условиях связана с отсутствием дополнительных генов, обычно участвующих в биосинтезе и созревании функционального апопротеина нитрогеназы (van der Meer et al., 2010; Klatt et al., 2013; Thiel et al., 2017; Nishihara et al., 2018).

Представители семейства *Chloroflexaceae* в качестве единственного источника азота могут использовать аммоний и некоторые аминокислоты – аланин, глутамат, глутамин, аспартат, глицин и серин, но не нитраты (Heda, Madigan, 1986; Hanada, 2014). Способность к азотфиксации и активность нитрогеназы не были обнаружены у четырех штаммов *Chloroflexus aurantiacus*, что коррелирует с их термофилией (Heda, Madigan, 1986; Hanada,

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365621040066 для авторизованных пользователей.

2014). Впоследствии эти данные были подтверждены при анализе генома *Cfl. aurantiacus*, в котором не были выявлены структурные гены нитрогеназы и нитратредуктазы (Tang et al., 2011).

Фотоавтотрофные бактерии семейства *Oscillochloridaceae*, являющиеся основным объектом данного исследования, являются мезотрофными микроорганизмами с оптимумом роста при 28–30°C (Кеппен и соавт., 1993). Основным источником азота для роста *Oscillochloris trichoides* DG-6 – типовой штамма семейства *Oscillochloridaceae*, является аммоний, а также аминокислоты аспарагин, глицин, глутамат, глутамин (Кеппен и соавт., 1989). Отличительной особенностью *Osc. trichoides* от бактерий, принадлежащих к родам *Roseiflexus* и *Chloroflexus*, является его способность использовать для роста N₂ в качестве единственного источника азота (Кеппен и соавт., 1989). Впоследствии были проведены амплификация и секвенирование гена *nifH*, детерминирующего редуктазу нитрогеназы, ключевой фермент нитрогеназного комплекса на матрице ДНК трех штаммов *Oscillochloris*, включая *Osc. trichoides* DG-6 (Tourova et al., 2006).

Целью данной работы являлся сравнительный анализ геномных данных, касающихся предположительных реакций азотного метаболизма у культивируемых АФНБ порядка *Chloroflexales*, а также экспериментальное подтверждение осуществления этих реакций бактериями штамма *Osc. trichoides* DG-6.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактерии и условия их культивирования. Объектом исследования была аноксигенная нитчатая фототрофная бактерия (АНФБ) *Osc. trichoides* DG-6. Культуры выращивали на модифицированной среде DGN с комплексом витаминов, 0.1% ацетата, 0.1% бикарбоната и 0.1% сульфида (Кеппен et al., 1994). Культивирование бактерий проводили в анаэробных условиях на свету на магнитной мешалке (300 об./мин) при температуре 28–30°C и освещенности 2000 лк во флаконах на 500 мл с завинчивающимися пробками. Если в качестве источника азота использовали N₂, флаконы содержали 300 мл среды и молекулярный азот в качестве газовой фазы. Когда в качестве источника азота использовали аммоний или глутамат, флаконы заполняли средой полностью.

Получение экстрактов клеток. Для получения бесклеточных экстрактов культуры, находящиеся в конце экспоненциальной фазы роста, центрифугировали (9000 об./мин при 6–8°C), отмывали 0.05 М *trisc*-HCl буфером (pH 7.5) и разрушали клетки на X-прессе (“ЛКВ”, Швеция) при избыточном давлении 10 т/см². Неразрушенные клетки и крупные фрагменты отделяли центрифугированием при 35000 g в течение 1 ч. Получившейся су-

пернатант использовали для определения ферментативной активности.

Определение активности ферментов. Реакции и катализирующие их ферменты путей N-метаболизма *Osc. trichoides* DG-6, активность которых измерялась в данной работе, представлена в табл. 1. Активность ферментов определяли на спектрофотометре Hitachi 200 (“Hitachi”, Япония) по окислению НАД(Ф)Н и восстановлению НАД(Ф) при 340 нм.

Реакционные смеси для определения активности ферментов содержали соответственно:

(1) глутаматдегидрогеназы (ГДГ): кетоглутарат – 5×10^{-3} М, NH₄Cl – 4×10^{-2} М, НАД(Ф)Н – 2.5×10^{-4} М; *trisc*-HCl (pH 7.5) – 5×10^{-2} М;

(2) глутаматсинтазы (ГОГАТ): кетоглутарат – 5×10^{-3} М, глутамин – 5×10^{-3} М, НАД(Ф)Н – 2.5×10^{-4} М; *trisc*-HCl (pH 7.5) – 5×10^{-2} М;

(3) глутамат-оксалоацетат трансминазы (ГОТ): НАД – 2.5×10^{-4} М, кетоглутарат – 4×10^{-3} М, аспартат – 4×10^{-3} М, фосфатный буфер (pH 7.4) – 0.1 М, малатдегидрогеназа – 1.25 мг/мл;

(4) глутамат-пируват трансминазы (ГПТ): НАД – 2×10^{-4} М, кетоглутарат – 4×10^{-3} М, фосфатный буфер (pH 7.5) – 0.1, аланин – 8×10^{-3} М, лактатдегидрогеназа – 1.25×10^{-3} мг/мл;

(5) глутаминазы (ГА): глутамин 4×10^{-3} М, *trisc*-HCl (pH 7.5) – 5×10^{-2} М, глутаматдегидрогеназа – 0.15 ед./мл.

Активность глутаминсинтетазы (ГС) измеряли, как описано ранее (Ivanovsky, Khatipov, 1994).

Во все реакционные смеси вносили экстракт клеток, содержащий 1.0–2.0 мг/мг белка.

Биоинформатический анализ. Реконструкцию возможных путей метаболизма азота на основании сравнения геномов культивируемых штаммов АФНБ порядка *Chloroflexales* проводили с использованием онлайн-сервисов NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) PATRIC (<https://www.patricbrc.org>) и KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Сравнение кластеров *nif*-генов проводили с использованием онлайн-сервиса Gene Graphics (<https://katlabs.cc/genegraphics/app>).

Белок измеряли по методу Лоури.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Потенциальные функциональные характеристики азотного метаболизма культивируемых штаммов АФНБ порядка *Chloroflexales* на основе сравнения их геномов. Было проведено сравнение представленных генов, детерминирующих ферменты путей метаболизма азота (“Nitrogen methabolism”) и аланина, аспартата и глутамата (“Alanine, aspartate and glutamate methabolism”) на основании базы данных KEGG в геномах культивируемых

Таблица 1. Реакции и катализирующие их ферменты путей N-метаболизма *Osc. trichoides* DG-6, активность которых измерялась в данной работе

Фермент	Метка локуса гена в геноме (locus_tag)	Реакция
Нитрогеназа EC 1.18.6.1	OSCT_0062 OSCT_0063 OSCT_0064 OSCT_0065	$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16P_i$
Глутаматдегидрогеназа (ГДГ) EC 1.4.1.2; EC 1.4.1.4	OSCT_0145	Глутамат + НАД(Ф) ⁺ + H ₂ O → α-кетоглутарат + НАД(Ф)Н + NH ₃
Глютамин синтаза (ГС) EC 6.3.1.2	OSCT_1286	Глутамат + NH ₄ + АТФ → глютамин + АДФ + Ф _н
Глютаматсинтаза (ГОГАТ) EC 1.4.1.13	OSCT_0551	2Глутамат + НАДФ ⁺ → глютамин + α-кетоглутарат + НАДФН
Глютамат-оксалоацетат трансминаза (ГОТ) EC 2.6.1.1	OSCT_0733 OSCT_1058 OSCT_1297 OSCT_3177	Аспартат + α-кетоглутарат → оксалоацетат + глютамин
Глутамат-пируват трансминаза (ППТ) EC 2.6.1.2	OSCT_0566	α-Кетоглутарат + аланин → глютамин + пируват

штаммов родов *Oscillochloris*, *Chloroflexus* и *Roseiflexus* (рис. S1a, S1b).

На тепловой карте предполагаемых ферментов метаболизма азота, согласно геномным данным, у всех сравниваемых штаммов представлены ферменты преобразования глутамата: глютаматсинтаза (ГОГАТ) (НАД(Ф)Н) (EC 1.4.1.13); глютамин синтетатаза (ГС) (EC 6.3.1.2) и глютаматдегидрогеназа (ГДГ) в двух функциональных вариантах — НАДН (EC 1.4.1.2) и НАД(P)Н (EC 1.4.1.4). Эти же ферменты представлены у всех сравниваемых штаммов так же и на тепловой карте ферментов метаболизма аланина, аспартата и глутамата.

Представленность остальных предполагаемых ферментов метаболизма азота заметно различается в зависимости от таксономической принадлежности сравниваемых штаммов. Нитрогеназа (EC 1.18.6.1), обеспечивающая фиксацию молекулярного азота, аннотирована только в геномах штаммов *Oscillochloris* и *Roseiflexus*, так же, как и карбоангидраза (EC 4.2.1.1). Гидроксиламинредуктаза (EC 1.7.99.1) аннотирована только для штаммов *Oscillochloris*, а нитратредуктаза (EC 1.7.99.4) — только для штаммов *Roseiflexus*. Большинство ферментов метаболизма аланина, аспартата и глюконата аннотированы в геномах всех сравниваемых штаммов, однако аланиндегидрогеназа (EC 1.4.1.1) аннотирована

только у штаммов *Roseiflexus*, а аланинтрансминаза (EC 2.6.1.2) — только у штаммов *Oscillochloris*.

Отсутствие генов, детерминирующих ферменты ассимиляционной и диссимиляционной нитратредукции в геномах культивируемых штаммов родов *Chloroflexales* и *Oscillochloris*, объясняет ранее полученные экспериментальные данные о неспособности АФНБ этих родов расти на средах, содержащих окисленные соединения азота. В то же время, подтверждаются сведения об использовании восстановленных соединений азота (аммония, мочевины, глутамата и ряда аминокислот) для роста штаммов родов *Chloroflexus* и *Oscillochloris* (Heda, Madigan, 1986; Кеппен и соавт., 1993; Кеппен et al., 2000). Результатам сравнительного геномного анализа соответствуют также ранее полученные данные о неспособности АФНБ рода *Chloroflexus* к фиксации молекулярного азота (Heda, Madigan, 1986) и, наоборот, способности к этому пути метаболизма азота АФНБ рода *Oscillochloris* (Кеппен и соавт., 1989; Ivanovsky, Khatipov, 1994; Кеппен et al., 2000).

Источники азота, используемые *Osc. trichoides* DG-6. Источниками азота для *Osc. trichoides* DG-6 могут служить аммоний, N₂, а также аминокислоты: аспарагин, глицин, глутамат, глютамин (табл. 2).

Ассимиляция молекулярного азота у *Osc. trichoides* DG-6. Присутствие гена *nifH*, детермини-

Таблица 2. Рост *Osc. trichoides* DG-6 на среде с разными источниками азота (мг белка/л)*

Источник азота	Накопление биомассы
Аммоний	23.3
Глутамат	22.2
Аспарат	26.0
Аспарагин	11.2
Мочевина	23.4
N ₂	1.2

* Время культивирования – 48 ч.

рующего ключевой фермент фиксации молекулярного азота, было выявлено ранее в экспериментах по амплификации этих генов не только для типового штамма DG-6, но и для нескольких близких к нему штаммов, также отнесенных к виду *Osc. trichoides* (Tourgova et al., 2006). Функциональная активность нитрогеназы была ранее подтверждена ростом культуры в присутствии N₂, как единственного источника азота (Кеппен et al., 1989). В данной работе, на основании способности клеточной суспензии к восстановлению ацетилена, показана активность нитрогеназы при росте штамма DG-6 на N₂, которая репрессируется при добавлении восстановленных соединений азота (табл. 3). Фермент нитрогеназа представлен на карте метаболизма азота в базе данных KEGG на основании данных анализа генома *Osc. trichoides* DG-6 (рис. S2a). Согласно этим данным, ранее обнаруженный ген редуктазы нитрогеназы *nifH* находится в составе генного кластера (OSCT_0062, OSCT_0063, OSCT_0064, OSCT_0065), включающего также гены субъединиц нитрогеназы (*nifD* и *nifK*) и вспомогательный гена *nifB* (рис. 1). Таким образом, в настоящее время *Osc. trichoides* DG-6 является единственным представителем порядка *Chloroflexales*, способность к азотфиксации которого доказана как геномными данными, так и экспериментально. Однако геномные данные свидетельствуют о том, что вновь выделенные виды АНФБ “*Candidatus Oscillochloris kuznetsovii*” и “*Candidatus Oscillochloris fontis*”, “*Candidatus Chloroploca asiatica*” и “*Candidatus Viridilinea mediisalina*”, возможно, способны к диазототрофии, благодаря наличию у них кластера генов нитрогеназы (Grouzdev et al., 2018, 2019; Gaisin et al., 2019a, 2019b, 2020), гомологичного кластеру *nifHBDK* штамма *Osc. trichoides* GD-6. Учитывая,

что *nifHBDK* кластеры аннотированы также в геномах других представителей семейства *Oscillochloridaceae*, в том числе, некультивируемых и таксонов-кандидатов, можно предположить, что способность к азотфиксации является свойством, имманентным для всего этого семейства.

В то же время, в геномах культивируемых штаммов АФНБ рода *Roseiflexus* также аннотирован кластер нитрогеназных генов, сходный по структуре с *nifHBDK*-кластером представителей рода *Oscillochloris*, за исключением обнаруженного в нем перекрытия генов (рис. 1). При этом сведений о функциональной активности нитрогеназы у культивируемых штаммов *Roseiflexus* spp. не имеется, а типовой штамм *Rof. castenholzii* не способен расти на N₂ в качестве единственного источника азота (Thiel et al., 2017). Однако высказанное ранее предположение о том, что это связано с отсутствием других генов, *nifE* и *nifN*, детерминирующих минимальный набор вспомогательных белков для созревания нитрогеназы (Dos Santos et al., 2012), становится сомнительным, принимая во внимание функциональность аналогичного *nifHBDK*-кластера у штаммов *Oscillochloris*. Можно предположить, что перекрытие генов в кластере свидетельствует о мутационном процессе, связанном с потерей функциональности генов нитрогеназы у штаммов рода *Roseiflexus* в связи приспособлением их к термофильным условиям обитания.

Можно отметить, что экспериментальные свидетельства существования экстремально упрощенного, но функционального кластера генов нитрогеназы может быть существенным для потенциальных биотехнологических исследований по имплантации этих генов в геном растений.

Ассимиляция восстановленных соединений азота у *Osc. trichoides* DG-6. Как и у большинства фототрофных бактерий, лучший рост *Osc. trichoides* DG-6 наблюдается на средах с восстановленными соединениями азота (табл. 2). Карты путей метаболизма азота и аланина, аспартата и глутамата, основанные на анализе генома *Osc. trichoides* DG-6 в базе данных KEGG, показаны на рис. S2a, S2b. В данной работе исследовалась активность этих ферментов в клетках *Osc. trichoides* DG-6, выросших на средах с разными источниками азота (табл. 2). Полученные результаты показывают, что, несмотря на присутствие в анализируемом геноме всех генов, детерминирующих ферменты путей ассимиляции аммония, реализация этих путей у клеток, выросших с использованием раз-

Таблица 3. Активность нитрогеназы у *Osc. trichoides* DG-6 (нмоль/мин мг белка)

Фермент/субстрат в ростовой среде выращивания	Глутамат, 0.1%	NH ₄ ⁺ , 0.1% ⁺	N ₂
Нитрогеназа	0.9	0.0	3.2

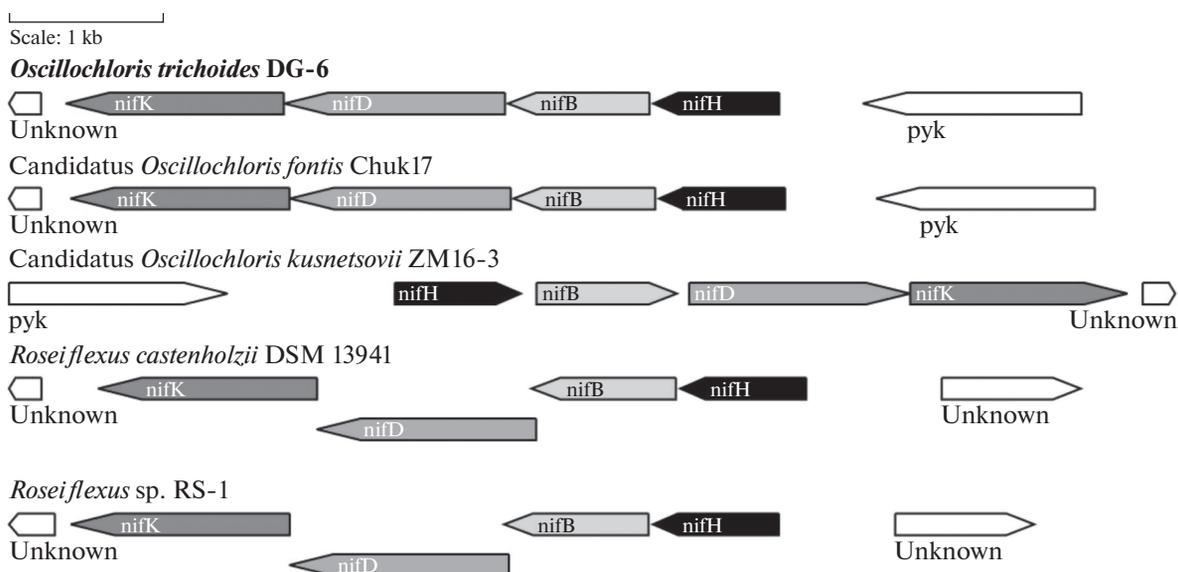


Рис. 1. Структура геномных кластеров, содержащих аннотированные *nif*-гены у представителей семейств *Oscillochloridaceae* и *Roseiflexaceae*.

личных источников азота, может различаться (рис. 2). Так же, как и у других АФНБ, аммоний может включаться в метаболизм *Osc. trichoides* DG-6, используя ГС-ГОГАТ путь. Согласно геномным данным, ферменты этого пути глутаминсинтетаза (ГС – ЕС 6.3.1.2) и глутаматсинтаза (ГОГАТ – ЕС 1.4.1.13), детерминированные каждая одним геном (OSCT_1286 и OSCT_0551 соответственно), присутствуют на рассматриваемых картах метаболизма (рис. S2a, S2b). Однако активность ГС обнаруживалась только при росте на среде с глутаматом (табл. 4), но не на средах с аммонием, в отличие от *Cfl. aurantiacus*, у которого измеренная активность этого фермента была даже более высокой на средах с аммонием, чем на средах с глутаматом (Kaulen, Klemme, 1983).

Согласно полученным в данной работе данным, штамм *Osc. trichoides* DG-6 при росте на среде с аммонием использует вариант ассимиляции аммония при участии глутаматдегидрогеназы (рис. 2). Глутаматдегидрогеназы (ГДГ – ЕС 1.4.1.2 и 1.4.1.4), детерминируются единственным геном (OSCT_0145), аннотированном в геноме *Osc. trichoides* DG-6 (рис. S2a, S2b). Продукт экспрессии этого гена имеет двойную субстратную специфичность и может использовать для реализации реакции как НАД, так и НАДФ. Двукратное увеличение активности НАД-зависимой изоформы фермента в экстрактах клеток, выросших на среде с аммонием, может указывать на ее преимущественное участие в ассимиляции данного субстрата (табл. 4).

При росте *Osc. trichoides* DG-6 на среде с глутаматом в качестве единственного источника азота, в клетках обнаруживаются все ферменты, необхо-

димые для реализации ГС-ГОГАТ пути (табл. 4). Однако для осуществления глутаминсинтетазной реакции необходим отсутствующий в среде аммоний, источником которого может служить глутаматдегидрогеназная реакция (рис. 2), поскольку активность обоих изоферментов ГДГ обнаружена и в клетках, выросших на среде с глутаматом (табл. 4).

По-видимому, ГС-ГОГАТ путь у *Osc. trichoides* реализуется также в процессе азотфиксации. Однако для доказательства этого утверждения требуются дополнительные исследования.

Ген аланиндегидрогеназы (АДГ – ЕС 1.4.1.1) у *Osc. trichoides* не аннотирован, что исключает участие

Таблица 4. Активность ферментов, участвующих в ассимиляции аммония у *Osc. trichoides* DG-6 (нмоль/мин мг белка)

Фермент/ источник азота	Глутамат, 0.1%	NH ₄ ⁺ , 0.1% ⁺
ГДГ НАДН	3.2	6.5
ГДГ НАД(Ф)Н	3.2	2.0
ГОГАТ НАДН	1.9	2.0
ГОГАТ НАД(Ф)Н	0.9	2.0
ГС	20.2	0.0
ГА	4.0	4.9
ГОТ	42.1	70.5
ГПТ	47.3	7.8

Примечание. Активность ферментов в клетках, выросших на среде с молекулярным азотом, не измеряли вследствие недостатка биомассы, синтезируемой в этих условиях.

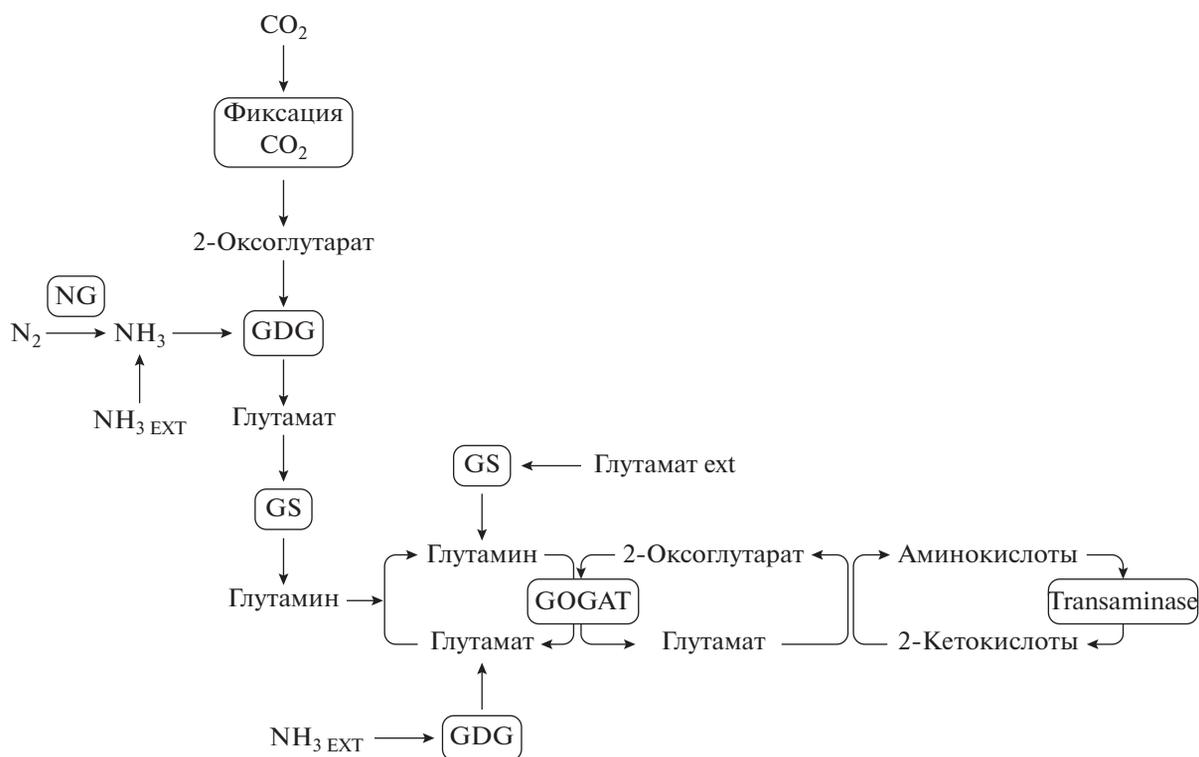


Рис. 2. Азотный метаболизм *Osc. trichoides* DG-6 при использовании различных источников азота.

этого фермента в процессе ассимиляции аммония у этой АФНБ, так же как и у *Cfl. aurantiacus*, в геноме которого этот ген также не аннотирован, а активность фермента не обнаружена (Kaulen, Klemme, 1983). Однако у *Osc. trichoides* аннотирован ген аланинтрансаминазы (ГПТ – ЕС 2.6.1.2) что отличает *Osc. trichoides* от других культивируемых штаммов представителей порядка *Chloroflexales*. Активность этого фермента была более высокой на среде с глутаматом, чем на средах с аммонием, аналогично другому ферменту – аспартаттрансаминазе (ГОТ – ЕС 2.6.1.1) (табл. 4). Высокие активности ферментов трансаминирования согласуются со способностью *Osc. trichoides* использовать для роста аминокислоты в качестве источников азота.

Полученные в данной работе данные об особенностях азотного метаболизма *Osc. trichoides* DG-6 при использовании различных источников азота суммированы в рис. 2.

Можно заключить, что комплексные исследования генетических и ферментативных аспектов органического N-метаболизма позволяют прояснить экологические и эволюционные особенности АФНБ семейства *Oscillochloridaceae* и возможность использования их метаболический потенциал в биотехнологии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-54-12031 НННО_а).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кеппен О.И., Лебедева Н.В., Трошина О.Ю., Родионов Ю.В. Нитрогеназная активность нитчатой фототрофной зеленой бактерии // Микробиология. 1989. Т. 58. С. 520–521.
- Кеппен О.И., Лебедева Н.В., Трошина О.Ю., Родионов Ю.В. The nitrogenase activity of filamentous phototrophic green bacterium // Microbiology (Moscow). 1989. V. 58. P. 520–521.
- Кеппен О.И., Баулина О.И., Лысенко А.М., Кондратьева Е.Н. Новая зеленая бактерия, относящаяся к семейству *Chloroflexaceae* // Микробиология. 1993. V. 62. P. 267–275.

- Keppen O.I., Baulina O.I., Lysenko A.M., Kondratieva E.N. A new green bacterium belonging to the *Chloroflexaceae* family // *Microbiology (Moscow)*. 1993. V. 62. P. 179–185.
- Dos Santos P.C., Fang Z., Mason S.W., Setubal J.C., Dixon R. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes // *BMC Genomics*. 2012. V. 13. Art. 162.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-162>
- Gaisin V.A., Burganskaya E.I., Grouzdev D.S., Ashikhmin A.A., Kostrikin N.A., Bryantseva I.A., Koziyeva V.V., Gorlenko V.M. “*Candidatus Viridilinea mediisalina*”, a novel phototrophic *Chloroflexi* bacterium from a Siberian soda lake // *FEMS Microbiol. Lett.* 2019a. V. 366. Art. fnz043.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnz043>
- Gaisin V.A., Burganskaya E.I., Grouzdev D.S., Osipova N.S., Ashikhmin A.A., Sinetova M.A., Krutkina M.S., Bryantseva I.A., Sukhacheva M.V., Kochevkova T.V., Koziyeva V.V., Kalashnikov A.M., Gorlenko V.M. “*Candidatus Oscillochloris fontis*”: a novel mesophilic phototrophic *Chloroflexota* bacterium belonging to the ubiquitous *Oscillochloris* genus // *FEMS Microbiol. Lett.* 2019b. V. 366. Art. fnz097.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnz097>
- Gaisin V.A., Grouzdev D.S., Krutkina M.S., Ashikhmin A.A., Sinetova M.A., Osipova N.S., Koziyeva V.V., Gorlenko V.M. “*Candidatus Oscillochloris kuznetsovii*” a novel mesophilic filamentous anoxygenic phototrophic *Chloroflexales* bacterium from Arctic coastal environments // *FEMS Microbiol. Lett.* 2020. V. 367. Art. fnaa158.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa158>
- Grouzdev D.S., Burganskaya E.I., Krutkina M.S., Sukhacheva M.V., Gorlenko V.M. Genome sequence of “*Candidatus Viridilinea halotolerans*” Chok-6, isolated from a saline sulfide-rich spring // *Microbiol. Resour. Announc.* 2019. V. 8. Art. e01614-18.
<https://doi.org/10.1128/mra.01614-18>
- Grouzdev D.S., Rysina M.S., Bryantseva I.A., Gorlenko V.M., Gaisin V.A. Draft genome sequences of “*Candidatus Chloroploca asiatica*” and “*Candidatus Viridilinea mediisalina*”, candidate representatives of the *Chloroflexales* order: phylogenetic and taxonomic implications // *Stand. Genom. Sci.* 2018. V. 13.
<https://doi.org/10.1186/s40793-018-0329-8>
- Hanada S. The phylum *Chloroflexi*, the family *Chloroflexaceae*, and the related phototrophic families *Oscillochloridaceae* and *Roseiflexaceae* // *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea* / Eds. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. P. 515–532.
- Heda S.D., Madigan M.T. Utilization of amino acids and lack of diazotrophy in the thermophilic anoxygenic phototroph *Chloroflexus aurantiacus* // *J. Gen. Microbiol.* 1986. V. 132. P. 2469–2473.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa158>
- Ivanovsky R.N., Khatipov E.-A.A. Evidence of covalent modification of glutamine synthetase in the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* // *FEMS Microbiol. Lett.* 1994. V. 122. P. 115–119.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07153.x>
- Kaulen H., Klemme J.-H. No evidence of covalent modification of glutamine synthetase in the thermophilic phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus* // *FEMS Microbiol. Lett.* 1983. V. 201. P. 75–79.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1983.tb00092.x>
- Keppen O.I., Baulina O.I., Kondratieva E.N. *Oscillochloris trichoides* neotype strain DG-6 // *Photosyn. Res.* 1994. V. 41. P. 29–33.
<https://doi.org/10.1007/BF02184143>
- Keppen O.I., Tourova T.P., Kuznetsov B.B., Ivanovsky R.N., Gorlenko V.M. Proposal of *Oscillochloridaceae* fam. nov. on the basis of a phylogenetic analysis of the filamentous anoxygenic phototrophic bacteria, and emended description of *Oscillochloris* and *Oscillochloris trichoides* in comparison with further new isolates // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000. V. 50. P. 1529–1537.
<https://doi.org/10.1099/00207713-50-4-1529>
- Klatt C.G., Liu Z., Ludwig M., Kühl M., Jensen S.I., Bryant D.A., Ward D.M. Temporal metatranscriptomic patterning in phototrophic *Chloroflexi* inhabiting a microbial mat in a geothermal spring // *ISME J.* 2013. V. 7. P. 1775–1789.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2013.52>
- Nishihara A., Thiel V., Matsuura K., McGlynn S.E., Haruta S. Phylogenetic diversity of nitrogenase reductase genes and possible nitrogen-fixing bacteria in thermophilic chemosynthetic microbial communities in Nakabusa hot springs // *Microb. Environ.* 2018. V. 33. P. 357–365.
<https://doi.org/10.1264/jsmme2.ME18030>
- Tang K.-H., Barry K., Chertkov O., Dalin E., Han C.S., Hauser L.J., Honchak B.M., Karbach L.E., Land M.L., Lapidus A., Larimer F.W., Mikhailova N., Pitluck S., Pierson B.K., Blankenship R.E. Complete genome sequence of the filamentous anoxygenic phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus* // *BMC Genomics*. 2011. V. 12. P. 334.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-334>
- Thiel V., Hügler M., Ward D.M., Bryant D.A. The dark side of the Mushroom Spring microbial mat: Life in the shadow of chlorophototrophs. II. Metabolic functions of abundant community members predicted from metagenomic analyses // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 943.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00943>
- Tourova T.P., Spiridonova E.M., Slobodova N.V., Boulygina E.S., Keppen O.I., Kuznetsov B.B., Ivanovskii R.N. Phylogeny of anoxygenic filamentous phototrophic bacteria of the family *Oscillochloridaceae* as inferred from comparative analyses of the *rrs*, *cbbl*, and *nifH* genes // *Microbiology (Moscow)*. 2006. V. 752. P. 192–200.
<https://doi.org/10.1134/S0026261706020135>
- van der Meer M.T.J., Klatt C.G., Wood J., Bryant D.A., Bateson M.M., Lammerts L., Schouten S., Sinninghe Damsté J.S., Madigan M.T., Ward D.M. Cultivation and genomic, nutritional, and lipid biomarker characterization of *Roseiflexus* strains closely related to predominant *in situ* populations inhabiting Yellowstone hot spring microbial mats // *J. Bacteriol.* 2010. V. 192. P. 3033–3042.
<https://doi.org/10.1128/JB.01610-09>

Nitrogen Metabolism of an Anoxygenic Filamentous Phototrophic Bacterium *Oscillochloris trichoides* Strain DG-6

R. N. Ivanovsky^{1,*}, N. V. Lebedeva¹, O. I. Keppen¹, and T. P. Tourova²

¹Moscow State University, Moscow, 119191 Russia

²Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: mguru@mail.ru

Received February 21, 2021; revised March 23, 2021; accepted March 24, 2021

Abstract—The possible nitrogen sources for *Osc. trichoides* DG6, a typical strain of the *Oscillochloridaceae* family, are ammonium, N₂, glutamate, asparagine, glycine, and glutamine. The assimilation of molecular nitrogen occurs with the participation of nitrogenase, the structural gene of which, *nifH*, is located in the gene cluster which also includes the genes of the *nifD* and *nifK* nitrogenase subunits and the auxiliary *nifB* gene. Considering that *nifHBDK* clusters have been also annotated in the genomes of other members of the *Oscillochloridaceae* family, including uncultured and candidate taxa, it can be assumed that the ability to fix nitrogen is a property immanent for this entire family. The pathways for assimilating ammonium in the cells grown using different nitrogen sources may differ. *Osc. trichoides* DG6 growing in a medium containing ammonium assimilated it with the participation of glutamate dehydrogenase, which is determined by a single gene. The expression product of this gene has dual functionality and can be used to implement the reaction with both NAD and NADP. With the growth of *Osc. trichoides* DG6 on a medium with glutamate as the only nitrogen source all the enzymes necessary for the implementation of the GS–GOGAT pathway were found in the cells. However, for the glutamine synthetase reaction, ammonium, which was absent in the growth medium, was required. The source of ammonium may be glutamate metabolized through glutamate dehydrogenase.

Keywords: anoxygenic filamentous phototrophic bacteria, *Oscillochloris*, nitrogen metabolism, assimilation of N₂ and ammonium