

УДК 576.851.132

Ф.Д.Х. АЛ-ШАММАРИ (ИРАК), С.Л. ВАСИЛЕНКО, М.А. ТИТОК

## ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ ШТАММОВ-ДЕСТРУКТОРОВ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ

To create effective strains of aromatic carbon hydride destructors purposed based on the natural naphthalene strains, utilized a wide aspect of organic substrates and characterized by a relatively high level of activity of the key enzymes of the metabolism of naphthalene.

Ароматические углеводороды, попадающие в природную среду в результате аварийных разливов нефти и нефтепродуктов, при сгорании различных видов топлива, выбросах коксо-, газо- и нефтехимических производств, а также содержащиеся в выхлопных газах автомобилей, представляют серьезную опасность для всех звеньев естественных биоценозов, приводя к их изменению или полной трансформации. По химической природе ароматические углеводороды можно разделить на моноароматические (бензол, толуол, ксилол и др.) и полиароматические (нафталин, антрацен, фенантрен, бифенилы, пирен, бенз(а)пирен, дибенз(а)пирен, перилен и др.). Следует отметить, что промежуточным продуктом окисления некоторых моно- и полициклических ароматических углеводородов (например, бензола, толуола, ксилола, нафталина, фенантрена) является катехол и его производные, вследствие чего полная деградация этих соединений может происходить с участием одних и тех же ферментных комплексов. Основная роль в утилизации ароматических углеводородов в природной среде принадлежит микроорганизмам. Большим метаболическим потенциалом в отношении этих соединений обладают бактерии рода *Pseudomonas*, способные их полностью или частично трансформировать. Кроме того, представители этой таксономической группы характеризуются широким спектром катаболических реакций и могут утилизировать целый ряд органических соединений.

Хорошо изученными являются системы деградации нафталина. Утилизация этого соединения происходит в присутствии ферментных комплексов, обладающих широкой субстратной специфичностью. В частности, первый фермент окисления нафталина (нафталиндиоксигеназа) участвует в реакциях диоксигенирования, монооксигенирования, дегидратации, O- и N-деалкилирования и сульфокисления целого ряда ароматических углеводородов (более 70 соединений) [1].

Целью настоящей работы являлся поиск среди природных нафталинутилизирующих бактерий эффективных штаммов-деструкторов ароматических углеводородов.

## Материал и методика

Использовали 105 штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных из различных природных источников.

Для культивирования бактерий была взята полноценная (LB) и минимальная среда M9 [2]. Источником углерода и энергии являлись глюкоза, салицилат натрия, сукцинат натрия, нафталин, бромнафталин, нафтиламин, фенантрен, антрацен, пирен, бифенил, хлорированный бифенил, толуол, бензол, ксилол (мета-, пара-, орто-), камфора, бензиловый спирт, гексадекан, октан, керосин, дизельное топливо и нефть в концентрациях  $0,1 \div 0,2$  %.

**Определение динамики роста бактерий в минимальной среде с нафталином.** Бактериальные культуры в стационарной фазе роста разводили физиологическим раствором и вносили в 10 мл минимальной среды M9 (концентрация клеток составляла  $10^3$  кл./мл). Бактерии культивировали при  $28^\circ\text{C}$  с аэрацией. Через некоторые интервалы времени (12 ч) определяли количество выросших бактерий (кл./мл).

**Утилизация органических соединений.** Способность утилизировать органические соединения определяли путем выращивания бактерий на плотной или в жидкой среде, содержащей в качестве источника углерода исследуемый субстрат.

**Определение активностей ферментов.** Бактериальные клетки, достигшие логарифмической фазы, осаждали центрифугированием (5000 об/мин,  $0^\circ\text{C}$ , 10 мин), отмывали охлажденным  $0,05$  М калий-фосфатным буфером pH 7,0 (дважды) и ресуспендировали в этом же буфере до плотности  $0,2$  ( $\lambda=490$  нм, толщина кюветы 1 см). Клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе в течение 1,5 мин при  $0^\circ\text{C}$ . Обломки клеток удаляли центрифугированием (15 000 об/мин, 10 мин,  $0^\circ\text{C}$ ). Супернатант немедленно использовали в качестве бесклеточного экстракта для определения активностей ферментов. С этой целью в реакционную смесь с конечным объемом 3 мл вносили 100 мкл клеточного экстракта или субстрата при  $30^\circ\text{C}$ . Работа проводилась на спектрофотометре UV-160A (Shimadzu, Япония).

**Активность нафталиндиоксигеназы** определяли спектрофотометрически по уменьшению экстинкции НАДН реакционной смеси, содержащей 100 мкМ НАДН и 100 мкМ нафталина (спиртовой раствор), бесклеточный экстракт и  $0,05$  М фосфатный буфер pH 7,5, учитывая эндогенное потребление НАДН бесклеточным экстрактом ( $\lambda=340$  нм,  $\epsilon=6,220$   $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Удельную активность фермента выражали в микромолях (наномолях) потребленного НАДН в минуту на 1 миллиграмм общего бактериального белка, учитывая эндогенное окисление НАДН.

**Активность салицилатгидроксилазы** определяли спектрофотометрически по уменьшению экстинкции НАДН реакционной смеси, содержащей 100 мкМ НАДН и 100 мкМ салицилата, бесклеточный экстракт и  $0,05$  М фосфатный буфер pH 7,5, учитывая эндогенное потребление НАДН бесклеточным экстрактом ( $\lambda=340$  нм,  $\epsilon=6,220$   $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Удельную активность фермента выражали в микромолях (наномолях) потребленного НАДН в минуту на 1 миллиграмм общего бактериального белка, учитывая эндогенное окисление НАДН.

**Активность катехол-2,3-диоксигеназы** находили по скорости образования  $\alpha$ -оксимуконного полуальдегида в реакционной смеси, содержащей  $0,5$  мМ катехола, бесклеточный экстракт и  $0,05$  М трис-НСI буфер [pH 7,5] ( $\lambda=375$  нм,  $\epsilon=33,4$   $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). При высоких скоростях реакции бесклеточный экстракт разводили буфером 1:10. При наличии активности катехол-1,2-оксигеназы (K1,2O) этот фермент инактивировали нагреванием клеток или бесклеточного экстракта при  $55^\circ\text{C}$  в течение 10 мин. Удельную активность фермента выражали в микромолях (наномолях) образовавшегося  $\alpha$ -оксимуконного полуальдегида в минуту на 1 миллиграмм общего бактериального белка.

**Активность катехол-1,2-диоксигеназы** вычисляли по скорости образования *цис-цис*-муконата в реакционной смеси, содержащей  $5$  мМ Na ЭДТА,  $1$  мМ катехола, бесклеточный экстракт,  $0,05$  М фосфатный буфер [pH 7,0] ( $\lambda=260$  нм,  $\epsilon=16,9$   $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Добавление ЭДТА необходимо для ингибирования муконлактонизирующего фермента. Предварительно клетки обрабатывали  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $30$  мМ) для инактивации катехол-2,3-оксигеназы (K2,3O). Удельную активность фермента выражали в микромолях превращенного в *цис-цис*-муконат катехола в минуту на 1 миллиграмм общего бактериального белка.

## Результаты и их обсуждение

Ранее из 363 проб земли с территории Беларуси, Украины и Ирака было выделено 105 штаммов грамотрицательных нафталинутилизирующих бактерий, которые на основании первичной идентифи-

кации были отнесены к роду *Pseudomonas*. Способность изолированных бактерий расти на промежуточных продуктах деградации нафталина и наличие в клетках катехол-2,3-диоксигеназы позволили установить, что для всех исследованных бактерий промежуточным продуктом утилизации нафталина является салицилат, в последующем окисляющийся по мета-пути.

Отбор наиболее перспективных штаммов-деструкторов проводили по нескольким критериям, а именно высоким показателям скорости роста в среде с нафталином, способности использовать в качестве источника углерода ряд органических субстратов, относительно высокой активности ключевых ферментов метаболизма нафталина.

На первом этапе определяли скорость роста бактерий в среде с нафталином. Предполагалось, что данный показатель прямо или косвенно может быть связан с физиологическими особенностями изолированных микроорганизмов, в частности, зависеть от времени клеточного цикла, в ходе которого происходит удвоение и распределение генетического материала, а также от способности генов биодegradации эффективно экспрессироваться в том или ином генетическом окружении.

Показателем скорости роста в среде с нафталином служило время, необходимое бактериальной популяции для достижения стационарной фазы (исходная концентрация бактерий составляла  $10^3$  кл./мл). На основании полученных данных природные нафталинутилизующие бактерии были условно разделены на три группы: бактерии первой группы достигали стационарной фазы роста через 48 ч культивирования (60 штаммов), второй – через 72 ч (21 штамм) и третьей – через 96 ч (24 штамма) (табл. 1). Следует отметить, что установленная скорость роста является весьма невысокой. Это обусловлено небольшой концентрацией вносимых бактерий, которые не обеспечивали быстрое накопление промежуточного продукта метаболизма нафталина (салицилата), необходимого для индукции экспрессии *nah*-генов. Тем не менее полученные данные, безусловно, полезны для первичной характеристики бактерий, способных использовать в качестве источника углерода и энергии нафталин.

Таблица 1

#### Классификация природных нафталинутилизующих бактерий, основанная на скорости роста в среде с нафталином

Штаммы природных нафталинутилизующих бактерий		
Группа I	Группа II	Группа III
NL1–NL3, NL14, NL18–NL23, NL25, NL26, NL29, NL30, NL31, NL33, NL34, NL40, NL41, NL42, NL44–NL46, NL48, NL50, NL53, NL54, NL58–NL65, AL1, AL2, AL5, AL12, AL13, AL21, AL23–AL26, AL28–AL32, AL36–AL40, AL43, FD1-1, FD1-2, FD1-5	NL4, NL6, NL8, NL15–NL17, NL39, NL47, NL51, NL52, NL56, AL3, AL8, AL9, AL11, AL14, AL19, AL20, AL22, AL27, AL42	NL5, NL7, NL9–NL13, NL28, NL32, NL35, NL37, NL49, NL57, AL4, AL6, AL7, AL10, AL15–AL17, AL34, AL35, AL41, AL44

Общеизвестно, что бактерии рода *Pseudomonas* утилизируют широкий спектр органических субстратов [3]. Поскольку исследуемые микроорганизмы выделены из загрязненных почв, можно предположить, что для успешного существования в таких условиях они должны содержать гены биодegradации. Кроме того, нафталиндиоксигеназы, обеспечивающие первый этап окисления нафталина, участвуют в разложении других полициклических ароматических углеводородов, например, фенантрена. Для большинства грамотрицательных бактерий путь деградации фенантрена представляет собой лишь модификацию пути утилизации нафталина [4].

Для изучения метаболического потенциала изолированных бактерий определяли их способность использовать в качестве единственного источника углерода и энергии моноциклические ароматические углеводороды (камфору, бензол, толуол, ксилол и их производные), полициклические ароматические углеводороды (фенантрен и антрацен, пирен, бифенил, хлорированный бифенил, бромнафталин), ациклические углеводороды (гексадекан, октан), нефть и продукты ее переработки (дизельное топливо, керосин). В результате было выявлено 9 штаммов, способных использовать как единственный источник углерода и энергии от шести до тринадцати различных органических субстратов. Остальные штаммы утилизировали от одного до пяти соединений, а 7 штаммов не обладали дополнительными биодegradативными возможностями. При этом наиболее широким спектром утилизируемых субстратов характеризовались штаммы NL21, NL26, AL21. В частности, штамм NL26 рос на среде с бромнафталином, нафталином, фенантреном, антраценом, бифенилом, хлорированным бифенилом, мета- и пара-ксилолом, октаном, гексадеканом, керосином, дизельным топливом, а штамм AL21, кроме этого, дополнительно утилизировал камфору. Следует отметить, что эти штаммы характеризовались относительно высокой скоростью роста на среде с нафталином (отнесены к группе I). При этом ни один из исследованных штаммов не обладал способностью утилизировать нефть.

Гены, детерминирующие синтез ферментов, обеспечивающих утилизацию нафталина, входят в состав двух оперонов [5]. Установлено, что «верхний» оперон является достаточно консервативным и, как правило, имеет плазмидную локализацию. Первый ген «верхнего» оперона детерминирует синтез нафталиндиоксигеназы (НО) – фермента с широкой субстратной специфичностью. Продуктом окисления нафталина, детерминируемым генами «верхнего» оперона, выступает салициловая кислота, за дальнейшее расщепление которой отвечает «нижний» оперон. Первый ген «нижнего» оперона также детерминирует синтез фермента с широкой субстратной специфичностью – салицилатгидроксилазы (СГ), обеспечивающей превращение салицилата в катехол. Катехол-2,3-диоксигеназа (К2,3О) и катехол-1,2-диоксигеназа (К1,2О) обеспечивают расщепление катехола по мета- и орто-пути соответственно. Было установлено, что мета-путь всегда кодируется плазмидными генами, а орто-путь метаболизма катехола определяется, как правило, хромосомными детерминантами и редко генами плазмидного происхождения [5].

Регуляция экспрессии *nah*-оперонов осуществляется с участием регуляторных белков и требует наличия в среде индуктора. В качестве последнего выступают первичные или промежуточные продукты метаболизма. Добавление в среду салицилата (или нафталина, который медленно может быть метаболизирован в салицилат) приводит к опосредованной продуктом гена *nahR* активации транскрипции генов биодegradации. Предположительно, белок NahR связывается с салицилатом или салициловым альдегидом и переходит согласно модели позитивной регуляции в активную форму, обеспечивая активацию транскрипции *nah*-оперонов [5].

Активность ключевых ферментов катаболизма нафталина, а именно нафталиндиоксигеназы, салицилатгидроксилазы, катехол-2,3-диоксигеназы и катехол-1,2-диоксигеназы характеризует эффективность пути деградации нафталина. Кроме того, изучение названных ферментов позволяет опосредованно характеризовать гены плазмидного (НО, СГ, К2,3О) и хромосомного (К1,2О) происхождения, что в дальнейшем может обеспечить целенаправленное конструирование эффективных штаммов-деструкторов, содержащих определенные комбинации хромосомных и внехромосомных генетических детерминант.

На первом этапе было установлено, что все исследованные штаммы обладали индуцируемой системой экспрессии *nah*-генов, а именно активность ключевых ферментов (НО и СГ) зависела от наличия индукторов, которыми являются салицилат или нафталин. При использовании в качестве индуктора салицилата или нафталина активность ключевых ферментов метаболизма (НО и СГ) была примерно одинаковой.

Таблица 2

Активность ключевых ферментов метаболизма нафталина у природных бактерий деструкторов

Штамм	Количество утилизируемых субстратов	Скорость роста на нафталине	Активность ферментов, нмоль/мин (мг белка)			
			НО	СГ	К2,3О	К1,2О
AL21	13	I	31,36	79,3	19,11	103,89
NL26	12		73,44	30,18	193,73	59,98
NL21	10		67,90	50,51	2231,14	39,01
NL3	6		49,7	33,1	158,4	6,1
AL30	5		19,7	2,5	231,4	12,7
AL1	5		109,76	60,87	1177,29	124,91
NL1	5		36,1	14,2	6,5	4,7
AL32	4		28,5	4,2	793,7	31,6
NL42	4		15,9	15,9	2,7	5,3
AL38	1		13,8	13,8	55,0	0
NL61	1		117,0	60,9	1333,6	31,7
AL37	1		20,7	27,6	88,1	0
NL4	6		II	172,9	83,6	1171,9
AL11	4	49,0		63,7	0,9	27,0
NL49	4	III	50,6	4,5	229,0	11,8
NL5	4		90,6	103,3	617,49	35,77
AL35	3		22,7	3,2	501,1	19,4
NL9	3		170,0	34,0	3,6	23,5

Из анализа активностей ключевых ферментов метаболизма нафталина (табл. 2) можно сделать некоторые выводы. Во-первых, активность ключевых ферментов метаболизма нафталина не коррелирует со скоростью роста бактерий в среде с нафталином в качестве единственного источника углерода и

энергии. Например, активность НО у штаммов I группы варьирует от 13,8 до 170,0 нмоль/мин (мг белка), у штаммов II и III группы – от 22,7 до 172,9 нмоль/мин (мг белка). Такая же картина наблюдается для СГ, активность которой у штаммов I группы определяется в интервале от 2,5 до 79,3 нмоль/мин (мг белка), а у штаммов II и III группы –  $3,2 \div 103,3$  нмоль/мин (мг белка). Полученные данные позволяют предположить, что физиологические параметры роста бактерий в среде с нафталином зависят в большей степени от особенностей клеточного цикла (скорости деления клеток) и не связаны с эффективностью экспрессии генов метаболизма нафталина. Тем не менее в качестве эффективных штаммов-деструкторов предпочтительным может оказаться использование бактерий I группы, способных утилизировать широкий спектр органических субстратов, поскольку именно они могут обладать по сравнению с другими штаммами селективным преимуществом при попадании в среду, содержащую полициклические ароматические углеводороды. Быстрое увеличение численности бактериальной популяции, обусловленное особенностями клеточного цикла и широкими метаболическими возможностями, может обеспечить данным бактериям большую конкурентоспособность в борьбе за выживание в сложившихся микробиоценозах. Следовательно, при выборе штаммов-деструкторов оптимальным, на наш взгляд, является использование быстрорастущих бактерий (I группа), способных утилизировать широкий спектр органических соединений и характеризующихся относительно высокими активностями ключевых ферментов метаболизма нафталина (штаммы AL21, NL26, NL21). При этом существует реальная возможность увеличения активности ключевых ферментов метаболизма нафталина в клетках данных микроорганизмов за счет переноса в них Nah-плазмид из бактерий штаммов NL4, NL61 (содержат плазмиды биодegradации нафталина группы IncP-9) и AL1 (содержит плазмиду группы IncP-7) [6].

Работа проводилась при финансовой поддержке БРФФИ (грант № Б08Р-102) и ГППИ «Новые биотехнологии» (задание 1.08).

1. Jouanneau Y., Meyer C., Jakoncic J. et al. // Biochem. 2006. Vol. 45. № 40. P. 12380.
2. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
3. Habe H., Omori T. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2003. Vol. 67. № 2. P. 225.
4. Evans W.C., Fernley H.N., Griffiths E. // J. Biochem. 1965. Vol. 95. P. 819.
5. Yen K.-M., Gunsalus I.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. Vol. 79. P. 874.
6. Василенко С.Л., Титок М.А. // Микробиология. 2008. Т. 77. № 1. С. 16.

Поступила в редакцию 01.12.09.

**Фади Джауд Хамза Ал-Шамари** – аспирант кафедры микробиологии. Научный руководитель – М.А. Титок.  
**Светлана Леонидовна Василенко** – старший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов.  
**Марина Алексеевна Титок** – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии.