

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕГРАДАЦИИ НАФТАЛИНА ПЛАЗМИДСОДЕРЖАЩИМИ БАКТЕРИЯМИ *PSEUDOMONAS*

А.И. Чернова, Ф.Д.Х. Ал-Шаммари, Е.О. Корик, М.А. Титок

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

Повсеместно распространенные в природной среде обитания бактерии рода *Pseudomonas* утилизируют широкий спектр органических субстратов, в том числе полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), многие из которых обладают мутагенными и канцерогенными свойствами [1]. Способность использовать эти опасные ксенобиотики, как правило, определяется наличием в клетках данных микроорганизмов плазмид биодеградации [2, 3]. Определенный интерес представляют внехромосомные генетические элементы, детерминирующие деградацию нафталина. Данные плазмиды содержат в своем составе гены, определяющие синтез ферментов с широкой субстратной специфичностью, обеспечивающих окисление не только нафталина, но и других ароматических углеводородов, например, фенантрена, антрацена [4, 5]. Внесение плазмидсодержащих бактерий в естественную среду обитания способствует горизонтальному переносу генов, повышающему адаптивные свойства природных бактериальных популяций в условиях почв, загрязненных ПАУ [6–9].

Целью настоящей работы являлось изучение круга потенциальных хозяев плазмид биодеградации нафталина группы IncP-9 и IncP-7 и поиск эффективных плазмидсодержащих штаммов-деструкторов, пригодных для биоремедиации почв, загрязненных ПАУ.

Методы исследования

В работе использовали нафталинутилизирующие бактерии, выделенные из природной среды обитания (*P. putida* AL21, *P. putida* NL21, *P. putida* NL26, *P. putida* NL4, *P. putida* AL1, *P. fluorescens* NL61), а также штаммы бактерий *Pseudomonas* из коллекции кафедры микробиологии (*P. putida* M2, *P. mendocina* PM2, *P. putida* КТ 2442, *P. marginata* ТВ) и ИБФМ (Пушино-на-Оке), любезно предоставленные Филоновым А.Е. (*P. fluorescens* B894, *P. aurantiaca* B14, *P. vignae* B1025, *P. lachrimans* 7595, *P. aurefaciens* B1249, *P. palleronii* B1328, *P. pseudoalcaligenes* B1295, *P. caryofilly* B1296, *P. stutzeri* B975, *P. chlororaphis* B1391, *P. aeruginosa* ML4600 и *P. artrofaciens* 7967).

Для культивирования бактерий использовали полноценную среду LB и минимальную среду M9 [10]. Плотные среды содержали 1,5% агар-агар. В качестве источника углерода и энергии использовали глюкозу в концентрации 0,2%, либо нафталин в концентрации 100 мкг/мл.

Использовали коммерческие препараты антибиотиков стрептомицина и канамицина в концентрации 50 мкг/мл.

Скрещивания в отпечатках. Донорные бактерии наносили на поверхность полноценной агаризованной среды и выращивания в течение 18 часов, после чего методом реплик их переносили на среду с газонем реципиентных клеток. После 18 часов инкубирования сформировавшиеся колонии реплицировали на селективные среды. Результаты учитывали через 48–72 часа.

Скрещивания на мембранных фильтрах. Культуры донорных и реципиентных бактерий, находящиеся в логарифмической фазе роста, сгущали в 100 раз, смешивали в соотношении 1:1 и наносили на нитроцеллюлозный фильтр (Synrog 6, размер пор 0,45 мкм), помещенный на поверхность полноценной агаризованной среды. Бактерии инкубировали в течение 18 часов, после чего клетки смывали физиологическим раствором и из соответствующих разведений высевали на селективные среды. Результаты учитывали через 48–72 часов инкубирования при 28°C. Частоту переноса маркеров определяли отношением числа трансконъюгантов к общему числу клеток донора.

Стабильность наследования плазмид проверялась путем культивирования плазмидсодержащих бактерий (исходное количество которых составляло 10^3 кл/мл) в неселективных условиях (LB бульоне) до стационарной фазы роста при 28°C с последующим высевом на полноценную агаризованную среду и проверкой у сформировавшихся колоний сохранность плазмидных маркеров.

Определение эффективности биodeградации нафталина в модельных почвенных системах. Использовали смесь лесной и торфяной почвы, которую просеивали через сито с диаметром ячеек 5 мм и стерилизовали при 1 атм. 30 мин при 121°C . В почву (80 г) вносили растертый в порошок нафталин из расчета 1 г на 1 кг почвы и тщательно перемешивали. Ночные культуры бактерий разводили дистиллированной водой и инокулировали в почву (конечная влажность 50%). Системы инкубировали при комнатной температуре.

Для определения динамики роста бактерий и концентрации нафталина отбирали по 2 пробы из нескольких участков почвы весом 0,5 г через 1 час после внесения клеток, а также через 7 суток культивирования. Одну пробу вносили в 4,5 мл физиологического раствора, тщательно перемешивали и после соответствующих стандартных разведений высевали на чашки с полноценной питательной средой для подсчета числа жизнеспособных клеток. Вторую пробу использовали для определения концентрации нафталина, для этого ее разводили в 20 мл 75% метанола, инкубировали 30 мин при 37°C на качалке (280 об/мин), после чего центрифугировали 10 мин при 13000 об/мин и отбирали супернатант. Полученные образцы хранили при температуре -20°C .

Образцы анализировали на жидкостном хроматографе с масс-спектрометрическим детектором LCMS-QP8000α (Shimadzu, Japan). Аликвоту супернатанта объемом 20 мкл наносили на обратнофазную колонку Restec Allure C18 (150×4,6 мм; 5 μм; 60 ангстрем). Элюцию осуществляли со скоростью 0,5 мл/мин при 40°C в изократическом режиме мобильной фазой, содержащей 85% метанола и 0,1% уксусной кислоты.

Результаты и обсуждение

Одним из путей создания эффективных технологий очистки окружающей среды от полициклических ароматических углеводородов является использование для этих целей активных штаммов-деструкторов, содержащих плазмиды биodeградации [7–9]. Транспозонная организация катаболитных оперонов, локализованных в составе конъюгативных плазмид, обуславливает горизонтальный перенос генов биodeградации между природными бактериальными популяциями [11]. Плазмидсодержащие бактерии, внесенные в загрязненную почву, являются источником распространения генетически детерминированных признаков, обеспечивающих селективное преимущество содержащим их микроорганизмам в стрессовых условиях внешней среды. В почве, с устоявшимся микробиоценозом, внесенные бактерии-деструкторы будут либо сохраняться, либо постепенно элиминироваться. В обоих случаях может наблюдаться усиление процессов биоремедиации почв за счет горизонтального переноса D-плазмид между интродуцированными и аборигенными микроорганизмами, приводящими к возникновению новых комбинаций генов плазмидного и хромосомного происхождения, обладающих эффективными системами биodeградации. При этом обмен генетическим материалом происходит в любом направлении, в результате чего появляются новые плазмидсодержащие штаммы, возникающие как на основе внесенных так и резидентных бактерий [9]. Для моделирования процессов, происходящих в природной среде обитания, необходимо изучить эффективность деградации ксенобиотиков в модельных почвенных системах при внесении в нее бактерий, представляющие собой различные комбинации плазмиды-хозяина. В то же время подобного рода эксперименты позволяют выявить наиболее эффективные штаммы-деструкторы, пригодные для биоремедиации загрязненных почв.

В данной работе в качестве бактерий-хозяев Nah-плазмид использовали коллекционные и природные штаммы бактерий рода *Pseudomonas*. Анализ способности плазмид биodeградации нафталина группы несовместимости IncP-7 и IncP-9 передаваться и

наследоваться в различном генетическом окружении позволил не только определить круг потенциальных хозяев данных внехромосомных генетических элементов в природной среде обитания, но и оценить биодеградативные возможности сконструированных плазмидсодержащих бактерий. В этом плане особый интерес представляли бактерии *Pseudomonas*, стабильно наследующие Nah-плазмиды, способные эффективно размножаться в среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии нафталин, а также характеризующиеся способностью утилизировать широкий спектр органических соединений. Среди исследованных микроорганизмов, наиболее перспективными для биоремедиации загрязненных почв представлялись природные плазмидсодержащие бактерии *P. putida* AL21, *P. putida* NL21 (содержат Nah-плазмиды группы IncP-9) и *P. putida* NL26 (плазмиды не выявлены). Данные микроорганизмы, помимо нафталина, использовали в качестве источника углерода и энергии до 13 органических соединений и характеризовались высокой активностью ключевых ферментов метаболизма нафталина (нафталиндиоxygenазы, салицилатидроксилазы, катехол-2,3-диоксигеназы и катехол-1,2-диоксигеназы) [12]. Определенный интерес представляли коллекционные бактерии *P. putida* KT2442, на основе которых сконструированы штаммы-деструкторы ксенобиотиков [13, 14].

При выборе внехромосомных генетических элементов учитывали активность ключевых ферментов метаболизма ПАУ, детерминируемую генами внехромосомного происхождения (в данном случае высокую активность нафталиндиоxygenазы, салицилатидроксилазы, катехол-2,3-диоксигеназы). Такими свойствами характеризовались бактерии *P. putida* NL4, *P. fluorescens* NL61, содержащие Nah-плазмиды группы IncP-9 и *P. putida* AL1, наследующие плазмиду группы IncP-7 [12].

Известно, что признак утилизации нафталина не всегда эффективно экспрессируется в микроорганизмах, отличных от природных хозяев, и отсутствие хорошо диагностируемых селективных маркеров не позволяет изучить их наследование в клетках чужеродных бактерий. В связи с этим, в работе использовали транспозосодержащие варианты Nah-плазмид, в состав которых были встроены транспозоны miniTn5, детерминирующие устойчивость к канамицину или стрептомицину [15].

Для моделирования процесса, который может происходить в естественной среде, была определена способность транспозонсодержащих вариантов плазмид биодеградации группы IncP-9 и IncP-7 поддерживаться в клетках коллекционных и природных видов бактерий рода *Pseudomonas*. В качестве потенциальных хозяев использовали 15 видов коллекционных штаммов псевдомонад, а также природные нафталинутилизирующие бактерии *P. putida* AL21, *P. putida* NL21 и *P. putida* NL26. Как видно из данных, приведенных в таблице 1, плазмиды группы IncP-9 (pNL4 и pNL61) и IncP-7 (pAL1) способны путем конъюгации передаваться в клетки всех исследованных микроорганизмов (таблица 1). При этом, в бактериях коллекционных штаммов *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. marginata*, *P. mendocina* и *P. caryofilly* данные внехромосомные генетические элементы наследовались стабильно, а из клеток *P. lachrimans* и *P. chlororaphis* при культивировании в неселективных условиях утрачивались с вероятностью 1%–5%. В то же время плазида pAL1 группы IncP-7 и плазида pNL61 группы IncP-9 наследовались достаточно нестабильно в бактериях *P. palleronii* и *P. vignae* (утрачивались с частотой 47%). Известно, что плазмиды, принадлежащие к одной группе несовместимости не могут совместно поддерживаться в одной клетке. В связи с этим, в природные бактерии *P. putida* AL21 и *P. putida* NL21 (содержат Nah-плазмиды группы IncP-9) была передана плазида pAL1 группы IncP-7, а в бактерии *P. putida* NL26 (плазмиды не выявлены) плазида pAL1 группы IncP-7 и pNL4 группы IncP-9. При этом плазида pAL1 стабильно наследовалась в бактериях *P. putida* AL21 и утрачивалась с частотой 1%–7% из клеток *P. putida* NL21 и *P. putida* NL26, соответственно. Плазида pNL4 стабильно поддерживалась в бактериях *P. putida* NL26 (таблица 1).

Таблица 1 – Стабильность наследования Nah-плазмид в клетках бактерий рода *Pseudomonas*

Штамм-реципиент	Стабильность наследования плазмид (в %)		
	pAL1	pNL4	pNL61
<i>P. putida</i> KT2442	100	100	100*
<i>P. fluorescens</i> B894	100*	100	100*
<i>P. marginata</i> TB	100*	100	100
<i>P. mendocina</i> PM2	100*	100	100
<i>P. aurantiaca</i> B14	100*	94	95
<i>P. vignae</i> B1025	100*	100	53
<i>P. lachrimans</i> 7595	94	95	99
<i>P. aurefaciens</i> B1249	100	99	97
<i>P. palleronii</i> B1328	53*	100	100
<i>P. pseudoalcaligenes</i> B1295	100*	98	99
<i>P. caryofilly</i> B1296	100*	100	100
<i>P. stutzeri</i> B975	100*	98	100*
<i>P. chlororaphis</i> B1391	96*	97	99
<i>P. aeruginosa</i> ML4600	100*	98	99
<i>P. artrofaciens</i> 7967	73*	98	100
<i>P. putida</i> AL21	100*	**	**
<i>P. putida</i> NL21	99*	**	**
<i>P. putida</i> NL26	93*	100*	нд

* – плазмидсодержащие бактерии получены в скрещиваниях на мембранных фильтрах (для остальных штаммов плазмиды переданы в скрещиваниях в отпечатках); ** – плазмиды не передавали, поскольку реципиенты содержали те же плазмиды или плазмиды той же группы несовместимости; нд – трансконъюганты не получены. В качестве донора Nah-плазмид использовали *P. putida* M2 (met).

На следующем этапе была изучена динамика роста и эффективность утилизации нафталина плазмидсодержащими бактериями при внесении их в модельную почвенную систему. Контролем служили образцы почвы с нафталинов, в которую бактерии не вносились (положительный контроль, позволяющий определить естественное испарение нафталина), а также почва без нафталина (отрицательный контроль).

В результате проведенных экспериментов было установлено, что внесение в почву нафталинутилизирующих бактерий в концентрации 10^6 – 10^7 КОЕ/1г почвы обеспечивал за 7 суток возрастание их численности в среднем до 10^8 КОЕ/1г почвы. При этом наибольшей эффективностью деградации нафталина в почве характеризовались генетически сконструированные штаммы (таблица 2). В частности, высокая эффективность деградации нафталина свойственна штамму *P. putida* KT2442, содержащему плазмиду pNL61 группы IncP-9 или плазмиду pAL1 группы IncP-7. В то же время, комбинации двух плазмид группы IncP-9 и IncP-7 в клетках природных штаммов *P. putida* AL21, *P. putida* NL21, *P. putida* NL26 и *P. putida* AL1 достоверно увеличивало их биodeградационный потенциал (концентрация нафталина снижалась до уровня отрицательного контроля). Наименьшая деградация нафталина происходила при внесении в почву бактерий штамма *P. palleronii* B1328, содержащих плазмиду pNL4 (группы IncP-9) и бактерий *P. putida* NL4, содержащих плазмиду pAL1 (группы IncP-7) (таблица 2).

Таблица 2 – Деградация нафталина в модельной почвенной системе природными и генетически сконструированными штаммами-деструкторами

Штамм	Плаزمида (IncP-группа)		Концентрация клеток в почве (КОЕ/1г почвы)		Концентрация нафталина в почве через 7 суток (в %)
	резидентная	внесенная	Исходная	Через 7 суток	
<i>P. putida</i> AL1	Inc-7	нет	$6,3 \times 10^7$	$3,0 \times 10^8$	1,5
<i>P. putida</i> AL21	IncP-9	pAL1 (IncP-7)	$2,9 \times 10^7$	$8,0 \times 10^8$	0
<i>P. putida</i> NL21	IncP-9		$5,1 \times 10^7$	$3,9 \times 10^8$	0
<i>P. putida</i> NL26	не определена		$1,1 \times 10^7$	$8,0 \times 10^8$	0
<i>P. putida</i> NL4	IncP-9		$1,3 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	32
<i>P. mendocina</i> BKMB1299	нет		$3,7 \times 10^6$	$7,8 \times 10^8$	6,9
<i>P. putida</i> KT2442	нет		$2,2 \times 10^6$	$2,3 \times 10^8$	0,1
<i>P. stutzeri</i> B975	нет		$2,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^7$	0,1
<i>P. putida</i> NL4	IncP-9		нет	$2,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^8$
<i>P. putida</i> AL1	IncP-7	pNL4 (IncP-9)	$3,6 \times 10^7$	$4,0 \times 10^8$	0,1
<i>P. putida</i> NL26	не определена		$1,0 \times 10^8$	$2,6 \times 10^9$	0,1
<i>P. mendocina</i> PM2	нет		$3,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^8$	1,1
<i>P. putida</i> KT2442	нет		$2,5 \times 10^6$	$1,7 \times 10^8$	0,1
<i>P. paleronii</i> B1328	нет		$3,6 \times 10^6$	$2,3 \times 10^8$	67,8
<i>P. fluorescens</i> NL61	IncP-9		нет	$3,7 \times 10^6$	$7,1 \times 10^8$
<i>P. putida</i> AL1	IncP-7	pNL61 (IncP-9)	$1,5 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	0
<i>P. mendocina</i> PM2	нет		$3,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^8$	21,3
<i>P. putida</i> M	нет		$3,2 \times 10^6$	$2,0 \times 10^8$	0,1
<i>P. aureofaciens</i> B1393	нет		$2,9 \times 10^6$	$2,0 \times 10^8$	0,1
<i>P. putida</i> KT2442	нет		$1,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^8$	0
<i>P. putida</i> NL26	не определена	нет	$2,7 \times 10^6$	$1,9 \times 10^8$	0,3
<i>P. putida</i> AL21	IncP-9	нет	$3,2 \times 10^6$	$2,8 \times 10^8$	0,2
<i>P. putida</i> NL21	IncP-9	нет	$3,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^8$	0,3

Примечание. Концентрацию нафталина в почве определяли в % с учетом его естественного испарения.

Таким образом, в результате проведенного исследования было установлено, что плазмиды группы IncP-7 и IncP-9 передаются и достаточно стабильно наследуются в клетках чужеродных хозяев. Этот факт дает основание предполагать, что при внесении в загрязненную почву эффективных бактерий-деструкторов, содержащих Nah-плазмиды данных классификационных групп, будет наблюдаться горизонтальный перенос генов биодеградации между обитателями почвенной микрофлоры, что обеспечит увеличение их адаптивных способностей. В качестве эффективных штаммов-деструкторов могут быть использованы бактерии, способные утилизировать в качестве источников углерода и энергии широкий спектр органических соединений и содержащие в клетках плазмиды биодеградации (в частности, *P. putida* AL21, *P. putida* NL21, *P. putida* NL26).

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

Список литературы

1. Cerniglia, С.Е. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons / С.Е. Cerniglia // Curr. Opin. Biotechnol. – 1993. – Vol. 4. – P. 331–338.
2. Catabolic plasmids of environmental and ecological significance / G.S. Sayler [et al.] // Microbiol. Ecol. – 1990. – Vol. 19. – P. 1–20.
3. Boronin, А.М. Diversity of *Pseudomonas* plasmids: to what extent? / А.М. Boronin // FEMS Microbiol. Lett. – 1992. – Vol. 79. – P. 461–468.

4. Characterization of a naphthalene dioxygenase endowed with an exceptionally broad substrate specificity toward polycyclic aromatic hydrocarbons / Y. Jouanneau [et al.] // *Biochem.* – 2006. – Vol. 45, № 40. – P. 12380–12391.
5. Purification and characterization of a salicylate hydroxylase involved in 1-hydroxy-2-naphthoic acid hydroxylation from the naphthalene and phenanthrene-degrading bacterial strain *Pseudomonas putida* BS202-P1 / N.V. Balashova [et al.] // *Biodegradation.* – 2001. – Vol. 12, № 3. – P. 179–188.
6. Leahy, J.G. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment / J.G. Leahy, R.R. Colwell // *Microbiol. Reviews.* – 1990. – Vol. 54, № 3. – P. 305–315.
7. Effect of dissemination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation plasmids on 2,4-D degradation and on bacterial community structure in two different soil horizons / W. Dejonghe [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66, № 8. – P. 3297–3304.
8. Plasmid transfer from *Pseudomonas putida* to the indigenous bacteria on alfalfa sprouts: characterization, direct quantification, and in situ location of transconjugant cells / L. Mølbak [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – Vol. 69, № 9. – P. 5536–5542.
9. Горизонтальный перенос катаболических плазмид в процессе биодegradации нафталина в модельной почве / Л.И. Ахметов [и др.] // *Микробиология.* – 2008. – Т. 77, № 1. – С. 29–39.
10. Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Дж. Миллер. – М.: Мир, 1976. – 476 с.
11. Top, E. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters / E. Top, D. Springael, N. Boon // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2002. – Vol. 42. – P. 199–208.
12. Ал-Шаммари, Ф.Д.Х. Поиск эффективных штаммов-деструкторов ароматических углеводов / Ф.Д.Х. Ал-Шаммари, С.Л. Василенко, М.А. Титок // *Вестник БГУ.* – 2010. – Сер. 2, № 1. – P. С.35–39.
13. Genetic engineering of *Pseudomonas putida* KT2442 for biotransformation of aromatic compounds to chiral cis-diols / S.P. Ouyang [et al.] // *J. Biotechnol.* – 2007 – Vol. 132, № 3. – P. 246–250.
14. Effects of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and of naphthalene contamination on the soil bacterial community / N.C. Gomes [et al.] // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2005. – Vol. 54, № 1. – P. 21–33.
15. Василенко, С.Л. Особенности наследования плазмид биодegradации в клетках гомо- и гетерологичных хозяев / С.Л. Василенко, М.А. Титок // *Микробиология.* – 2008. – Т. 77, № 1. – С. 16–22.

EFFECTIVENESS DESTRUCTION OF NAPHTHALENE BY PLASMID-CONTAINING BACTERIA *PSEUDOMONAS*

A.I. Chernova, F.D.H. Al-Shammri, E.O. Korik, M.A. Titok

Belarusian State University, Minsk, Belarus

As result of carried out investigation was determined, that Nah-plasmids from group IncP-7 and IncP-9 are able to be transmitted and be maintained in cells of foreign hosts (as recipients were tested 15 species of collection strains of bacteria *Pseudomonas* and 5 strains of natural naphthalene utilizing bacteria *Pseudomonas*). The effectiveness destruction of naphthalene in model soil system, when plasmid-containing bacteria were introduced was determined (concentration of naphthalene has been decreasing from 32,2% to 100%). At the same time genetic constructed plasmid-containing bacteria (*P. putida* KT2442, containing plasmids from group IncP-9 or group IncP-7, and also natural bacteria, containing combination of two Nah-plasmids from groups IncP-9 and IncP-7) destructed naphthalene in the most effective way.