

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИЙ – ДЕСТРУКТОРОВ УГЛЕВОДОРОДОВ *RHODOCOCCLUS PYRIDINIVORANS* 5AP

Букляревич А.А.¹, Чернявская М.И.¹, Валентович Л.Н.^{1,2}, Охремчук А.Э.²,
Соляникова И.П.³, Делеган Я.А.³, Филонов А.Е.³, Титок М.А.¹

¹Белорусский государственный университет, Минск,
titok@bsu.by

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск,
valentovich@mbio.bas-net.by

³ФБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов, Пущино, Россия,
innap_solyan@yahoo.com, filonov.andrey@rambler.ru

Загрязнение окружающей среды углеводородами и их производными является актуальной проблемой последних десятилетий, решением которой занимаются природоохранные биотехнологии. Ключевыми факторами, влияющими на эффективность разложения поллютантов микроорганизмами, является наличие в геноме локусов, определяющих деградацию химических соединений [1], а также условия внешней среды (температура, pH, осмолярность и др.). Например, повышение температуры ведет к возрастанию растворимости углеводородов и усилению их токсичного воздействия на живые организмы [2-3]. Кроме того экспрессия некоторых генов биodeградации ингибируется в условиях повышенных температур [4]. Таким образом, деструкторы, перспективные для использования в широком диапазоне температур, должны обладать рядом физиолого-биохимических и, соответственно, генетических особенностей.

Объектом исследования являлись бактерии *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap, выделенные из загрязненной нефтепродуктами почвы, отобранной на территории Ливии.

Способность утилизировать углеводородные субстраты в качестве источника углерода определялась на плотной среде: керосин, дизельное топливо, гексан, нонан, гексадекан, бензол, толуол, орто-, пара- и метаксилолы, этилбензол, пиридин, нафталин – в виде паров; 2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонан и фенол – 0,1 % вносили в среду перед разливом в чашки Петри; антрацен, фенантрен, бифенил, флюорен, пирен – 0,02 % вносили в среду перед разливом в чашки Петри. Эффективность деградации нефти определяли гравиметрически, гексадекана – с помощью газовой хроматографии, фенола – спектрофотометрически [5-6]. Аннотацию генома проводили с помощью он-лайн ресурса RAST [7], отдельные детерминанты сравнивали с известными при помощи он-лайн ресурса BLAST [8].

Установлено, что бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap обладают широким спектром утилизируемых углеводородных субстратов, среди которых нефть,

керосин, дизельное топливо, неразветвленные (гексан, нонан, гексадекан) и разветвленные алканы (2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонан), моноциклические ароматические соединения (фенол, бензол, толуол, орто-, пара- и мета-ксилолы, этилбензол, пиридин), полициклические ароматические углеводороды (нафталин, 2-метилнафталин, антрацен, фенантрен, бифенил, флюорен, пирен). Причем исследуемые бактерии способны утилизировать нефть, керосин, дизельное топливо, гексан, октан, гексадекан, нафталин, 2-метилнафталин, фенантрен, бифенил, флюорен, а также ацетон и фенол как при умеренной (28 °С), так и при повышенной (42 °С) температуре.

Эффективность деградации нефти (при начальной концентрации 4 об.%) в течение 14 сут. составляла более 55 % при температуре 28 °С и 37 °С. Эффективность деградации гексадекана (1 %) в течение 3 сут. как при 28 °С, так и при 42 °С составляла около 75 %. Кроме того бактерии *R. pyridinivorans* 5Ar способны полностью утилизировать фенол (100 мг/л) в течение 2 ч при использовании предварительно адаптированной культуры или в течение 14 ч при внесении культуры, не подвергавшейся предварительной адаптации.

Безусловно, способность утилизировать широкий спектр углеводородных субстратов с высокой эффективностью генетически обусловлена. Так в хромосоме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar идентифицированы 14 генов цитохромов P450, которые могут участвовать в окислении как алифатических углеводородов, так и ряда других ксенобиотиков [9]. Также выявлены два гена, кодирующих алканмонооксигеназы (координаты: 3 425 727-3 426 971; 4 220 584-4 221 756 п.н.), которые определяют способность окислять алифатические углеводороды. Плазмидную локализацию имеют гены, кодирующие диоксигеназы, обеспечивающие окисление таких ПАУ, как нафталин (плазида pNAPH, NODE_46) и дибензофуран (плазида pDBF, NODE_44). При этом в кластере генов биodeградации нафталина присутствует ген *nidF*, продукт которого расширяет спектр субстратной специфичности нафталиндиоксигеназы, позволяя окислять моноциклические ароматические углеводороды (о-, п-, м-ксилолы, этилбензол) [10]. В хромосоме (координаты: 4 602 307-4 603 347 п.н.) выявлен ген, кодирующий фенолгидроксилазу. Также идентифицированы гены, кодирующие все ферменты, обеспечивающие полное расщепление катехола (промежуточного продукта утилизации многих ароматических соединений) по интра- и экстрадиольному путям (табл. 1). Данные гены имеют как хромосомальную, так и плазмидную локализацию.

Таблица 1 – Ферменты интра-и экстрацеллюлярного путей расщепления катехола

Фермент	Локализация (координаты, п.н.)
Катехол-2,3-диоксигеназа	Хромосома (4 604 532-4 605 626)
	Плазмида pNAPH (NODE_50, 7 203-8 084)
Дегидрогеназа 2-гидроксимуконического альдегида	Хромосома (4 607 794-4 609 272)
4-оксалокротонаттаутомераза	Хромосома (4 615 708-4 615 905)
4-оксалокротонатдекарбоксилаза	Хромосома (4 615 908-4 616 666)
Гидролаза 2-гидроксимуконического полуальдегида	Плазмида pNAPH (NODE_50, 3 588-4 451)
2-кето-4-пентеноатгидратаза	Хромосома (5 060 489-5 061 334)
4-гидрокси-2-оксвалератальдолаза	Хромосома (5 058 508-5 059 563)
	Плазмида pNAPH (NODE_46, 12 194-13 063)
Ацетальдегиддегидрогеназа	Хромосома (5 059 560-5 060 492)
	Плазмида pNAPH (NODE_46, 13 129-13 851)
Катехол-1,2-диоксигеназа	Хромосома (2 627 164-2 628 096; 4 282 536-4 283 441; 4 865 763-4 866 605)
Муконатциклоизомераза	Хромосома (4 836 411-4 837 760; 4 864 484-4 865 611)
Муконолактонизомераза	Хромосома (4 864 165-4 864 446)
β -Кетоадипат-енол-лактонгидролаза	Хромосома (639 210-640 010)
3-оксоадипат-коэнзим А-трансфераза (субъединицы А и В)	Хромосома (4 461 977-4 462 894, 4 462 891-4 463 667)
3-Кетоацил-коэнзим А-тиолаза	Хромосома (159 653-160 846)

Все вышеописанное позволяет эффективно использовать бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap в природоохранных биотехнологиях для удаления из окружающей среды как комплексных загрязнений (нефть, нефтепродукты), так и отдельных соединений (фенол) в широких температурных пределах (28-42 °С).

Литература

1. Larkin, M. J. Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility / M. J. Larkin, L. A. Kulakov, Ch. C. R. Allen // Curr. Opinion Biotechnol. - 2005. - № 16. - P. 282–290.
2. Northcott, G.L. Experimental approaches and analytical techniques for determining organic compound bound residues in soil and sediment / G.L. Northcott, K.C. Jones // Environ. Pollut. – 2000. – Vol. 108, № 1. – P. 19-43.
3. Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil / F. Coulon [et al.] // Chemosphere. – 2005. – Vol. 58, № 10. – P. 1439-1448.

4. Velázquez, F. The m-xylene biodegradation capacity of *Pseudomonas putida* mt-2 is submitted to adaptation to abiotic stresses: evidence from expression profiling of *xyl* genes / F. Velázquez, V. De Lorenzo, M. Valls // *Environ. Microbiol.* – 2006. – Vol. 8, № 4. – P. 591-602.
5. Другов, Ю. С. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов. Практическое руководство / Ю. С. Другов, А. А. Родин. – 2-е изд., перераб. и доп. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 270 с.
6. Разложение фенола штаммом *Rhodococcus opacus* 1G / Е.С. Шумкова [и др.] // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2009. – Т. 45, № 1. – С. 51-57.
7. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology [Electronic resource] / R.K. Aziz [et al.] // *BMC Genomics.* – 2008. – Vol. 9. – Article number: 75. - Mode of access: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-9-75>. - Date of access: 01.09.2016.
8. Basic local alignment search tool / S. F. Altschul [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1990. - Vol. 215, iss. 3. – P. 403-404.
9. van Beilen, J.B. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation / J. B. van Beilen, E. G. Funhoff // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 74. – P. 13-21.
10. Isolation and characterization of *o*-xylene oxygenase genes from *Rhodococcus opacus* TKN14 / T. Maruyama [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2005. - Vol. 71, iss. 12. - P. 7705–7715.