

АНАЛИЗ КЛЮЧЕВЫХ ДЕТЕРМИНАНТ БИОДЕГРАДАЦИИ НАФТАЛИНА В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ *RHODOCOCCLUS PYRIDINIVORANS* 5Ar

© 2023 г. А. Ю. Ларченко^а, *, М. И. Мандрик^а

^аБелорусский государственный университет, Минск, 220030 Беларусь

*e-mail: larch.alina@gmail.com

Поступила в редакцию 06.01.2023 г.

После доработки 21.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

В результате исследования установлено, что бактерии *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ar дикого типа являются высокоэффективными деструкторами нафталина и полностью утилизируют данное соединение в концентрации 500 мг/л в течение трех суток, что может быть использовано для очистки загрязненных нафталином водных экосистем. Инактивация генов биodeградации *narAa* (кодирует большую субъединицу нафталиндиоксигеназы) и *narB* (кодирует *цис*-нафталиндигидродиолдегидрогеназу) приводит к потере бактериями *R. pyridinivorans* 5Ar способности утилизировать нафталин в качестве единственного источника углерода. Это указывает на отсутствие в геноме исследуемых бактерий детерминант, обеспечивающих окисление нафталина по альтернативным путям. Помимо этого, инактивация гена *narB* приводит к накоплению в культуральной среде полярного окрашенного соединения (вероятно, продукта первичного окисления нафталина).

Ключевые слова: биodeградация нафталина, *Rhodococcus*, гены биodeградации, динамика роста, эффективность биodeградации, диоксигеназа

DOI: 10.31857/S0026365623600025, **EDN:** RIWQWF

Технологический прогресс и повсеместное развитие химической промышленности, в частности, нефтяной, активное применение нефтепродуктов и ряда потенциально опасных углеводородов приводит к глобальному загрязнению и наносит непоправимый ущерб окружающей среде. Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) относятся к одним из наиболее распространенных и токсичных среди поллютантов углеводородной природы и обладают не только канцерогенными и мутагенными свойствами, но и склонностью к биоаккумуляции (Хант, 1982). Пути их попадания в окружающую среду можно условно разделить на природные и антропогенные. К природным путям относятся такие явления, как лесные пожары и извержения вулканов, в то время как антропогенные факторы включают разливы нефти, сгорание топлива, каменноугольной смолы, бытовых отходов, а также отходов коксохимических производств (Haritash, 2009).

Несмотря на высокую токсичность и крайне низкую растворимость в воде, ПАУ могут служить источником углерода для некоторых микроорганизмов, в частности, для бактерий рода *Rhodococcus* (Kuyukina, 2010). Существует множество факторов, которые в той или иной степени оказывают влияние на скорость, эффективность

и продуктивность процесса биodeградации ПАУ (Vaidya, 2019). Для повышения степени доступности гидрофобных субстратов, в том числе ПАУ, бактерии продуцируют поверхностно-активные вещества (ПАВ) (Li, 2009). У родококков в биосинтезе этих соединений участвуют ферменты алканмоноксигеназы (Inaba, 2013). Помимо физико-химических свойств ПАУ, обуславливающих их низкую растворимость в воде, что затрудняет их разложение, есть еще ряд показателей, воздействующих на систему взаимодействия подобных субстратов и микроорганизмов (Сазыкин, 2009). Установлено, что с повышением концентрации поллютанта увеличивается и скорость его деградации, однако если концентрация слишком мала, т.е. ниже определенного порогового значения, то микроорганизмы могут игнорировать ксенобиотик как потенциальный субстрат, что проявляется в отсутствии каких-либо процессов его окисления. В то же время, если концентрация поллютанта слишком высока, то он может оказывать токсичное воздействие на микроорганизмы (Vaidya, 2019).

Бактерии рода *Rhodococcus* обладают повышенной устойчивостью к неблагоприятным и экстремальным условиям окружающей среды. Для них характерны психротрофия, гало-, ксеро-

и термотолерантность, устойчивость как к высоким, так и к низким значениям pH, а также резистентность к ксенобиотикам и ионам тяжелых металлов. Из этого следует, что применение бактерий данного рода в качестве деструкторов ПАУ и углеводородов нефти в целом, представляется возможным непосредственно *in situ* (Kuyukina, 2010).

Адаптация бактерий рода *Rhodococcus* к меняющимся и зачастую неблагоприятным условиям среды достигается благодаря стратегии гиперрекомбинации, ассоциированной с большим геномом, а также за счет особенностей клеточной физиологии и способности приобретать широкий круг различных катаболических генов. Большое количество детерминант катаболических путей обнаруживается в составе крупных линейных или кольцевых плазмид. К тому же для родококков характерно существование альтернативных путей катаболизма одного соединения и гомологичных генов, что еще более повышает катаболическое разнообразие и эффективность их как деструкторов (Larkin, 2005). В связи с этим крайне важным является исследование генетической организации бактерий-деструкторов и роли отдельных генетических детерминант в процессах биodeградации.

На сегодняшний день наиболее изучена генетическая организация оперона, включающего в себя гены нафталин-1,2-диоксигеназы, поскольку это ключевой и универсальный фермент на первых этапах биodeградации ПАУ. Гены составляют индуцируемый нафталином *nar*-кластер, включающий в себя следующие детерминанты: *narAa* и *narAb*, соответствующие большой и малой субъединицам диоксигеназы, гидроксилирующей ароматическое кольцо, соответственно, *narB*, кодирующий *цис*-нафталиндигидродiolдегидрогеназу, и *narC*, кодирующий гидратазу-альдолазу (Kulakov, 2005).

Помимо генов, кодирующих ключевые ферменты, в состав *nar*-кластера входят детерминанты, кодирующие рубредоксины — небольшие негемовые железосодержащие белки, участвующие в переносе электронов (*rub1*, *rub2* и *rub1bis*). Кроме того, имеется ген *narR1*, который кодирует GntR-подобный белок-регулятор транскрипции с доменом спираль—поворот—спираль, и *narR2*, XylR-подобный белок, активатор транскрипции, стартовый кодон которого перекрывается со стоп-кодоном *narR1* (Kulakov, 2005).

Между *narR2* и *rub1* у *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 обнаружен ген, кодирующий фермент транспозазу — *tnR7*, ниже которого находятся 7 открытых рамок считывания *orf1*—*orf7*, предполагаемые продукты которых имеют сходство с метил-акцептирующими белками хемотаксиса (*orf4* и *orf5* сходны с NahY у *Pseudomonas putida*), а также с некоторыми бензоат-специфичными порин-подобными белками (*orf6* с BenF *P. putida*).

Однако в другом исследовании установлено сходство *orf6* с геном, кодирующим транспозазу — *tn2R7*. Предположительно, существует еще ген *oxiA*, кодирующий продукт, который имеет высокое сходство с оксидоредуктазами *Streptomyces* и ФАД- или ФМН-содержащими дегидрогеназами *Corynebacterium*. Несмотря на высокий уровень сходства продуктов *orf1*—*orf7* с белками других микроорганизмов или с продуктами генов самих родококков, их функции остаются неизвестными (Kulakov, 2005; Kimura, 2006; Gennaro, 2010; Чернявская, 2015).

Целью исследования было изучение влияния инактивации некоторых генов *nar*-кластера на способность бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap расти в минеральной среде с нафталином в качестве единственного источника углерода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы и плазмиды. В исследованиях использовали бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap (Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси, № БИМ В-939 Г) и мутантные варианты, полученные на их основе в ходе инсерционного мутагенеза (табл. 1). Суицидальный вектор pK18mob (Km^r , LacZ') (Schäfer, 1994) использовали для клонирования целевых генов. Для отбора рекомбинантных молекул ДНК и последующего их введения в клетки родококков использовали штаммы *E. coli* XL1-Blue (Bullock, 1987) и GM2163 (Metcalf, 1994).

В ходе анализа использовали нуклеотидные последовательности плазмиды pNAPH (номер в GenBank NCBI NZ_CP063451.1) бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap.

Среды и растворы. Для получения ночных культур бактерии культивировали в жидкой питательной среде ПДБ (пептон — 10 г/л, дрожжевой экстракт — 5 г/л, NaCl — 8 г/л; pH 7.0–7.2). Способность утилизировать нафталин изучали при выращивании в жидкой минеральной среде К (Ившина, 1994) с добавлением раствора микроэлементов по Постгейту (Романенко, 1974). Для определения титра клеток проводили посев на пептонно-дрожжевую агаризованную среду ПДА (пептон — 10 г/л, дрожжевой экстракт — 5 г/л, NaCl — 8 г/л, агар — 15 г/л; pH 7.0–7.2).

Трансформацию *E. coli* осуществляли по методике, описанной в руководстве (Маниатис, 1984).

Тотальную ДНК бактерий выделяли саркозиевым методом (Kuyukina, Ivshina, 2010). Для выделения плазмидной ДНК использовали набор реактивов Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit ("Jena Bioscience", Германия).

Инсерционная инактивация генов *narAa* и *narB*. Суицидальный вектор pK18mob (Km^r), содержа-

Таблица 1. Характеристика мутантных вариантов бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap

Название мутантного варианта	Генотип	Характеристика и способ получения
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap <i>narAa::pK18mob</i>	<i>narAa</i> [−] Km ^r	Мутантный вариант с инактивированным геном <i>narAa</i> , кодирующим большую субъединицу нафталиндиоксигеназы (направленный инсерционный мутагенез с использованием суицидального вектора pK18mob)
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap <i>narB::pK18mob</i>	<i>narB</i> [−] Km ^r	Мутантный вариант с инактивированным геном <i>narB</i> , кодирующим <i>цис</i> -нафталинди-гидродиолдегидрогеназу (направленный инсерционный мутагенез с использованием суицидального вектора pK18mob)

Таблица 2. Праймеры для ПЦР, используемые в ходе исследования

Название гена	Название праймеров	Последовательности праймеров (5' → 3')	Размер ампликона, п.н.
<i>narAa</i> (<i>Rhodococcus</i>)	NarAaForward	TACCTCGGCGACCTGAAGTTCTA	625
	NarAaReverse	AGTTCTCGGCGTCGTCCTGTTTCGAA	
<i>narB</i> (<i>Rhodococcus</i>)	NarBForward	ACGTGCAAGAAGGCGCGAAA	653
	NarBReverse	ACGCTCCCGCGAGGCGAGAA	
—	M13modForward	CACACAGGAAACAGCTATGAC	—

ший фрагменты генов *narAa* или *narB*, вводили в клетки *R. pyridinivorans* 5Ap методом электро-трансформации (на приборе Bio-Rad Gene Pulser XCell Electroporation System (США), с использованием следующего режима: напряжение — 1800 В; емкость — 25 Ф; сопротивление — 200 Ом; просвет кюветы — 1 мм), что приводило к гомологичной рекомбинации данной конструкции с соответствующим участком гена и встраиванию плазмиды в ген таким образом, что он становился дефектным. Отбор мутантов проводили на среде ПДА с канамицином (25 мкг/мл). Наличие вставки в гене-мишени оценивали с помощью ПЦР. Для этого использовали набор реагентов (*Taq*-полимеразы с буфером, смесь дНТФ) и праймеры, комплементарные нуклеотидной последовательности вектора (M13modForward) и генам *narAa* или *narB* соответственно (табл. 2), производства ОДО “Праймтех” (Беларусь).

Сравнительная характеристика динамики роста штамма *R. pyridinivorans* 5Ap и его мутантных вариантов при культивировании с нафталином. Раствор нафталина в хлороформе (50 г/л) добавляли в стерильные колбы до конечной концентрации 500 мг/л из расчета общего объема среды 50 мл. После полного испарения растворителя в колбы с сухим нафталином вносили 50 мл минеральной

среды К, 50 мкл раствора микроэлементов по Постгейту и отмытую (дважды в физрастворе) ночную культуру до ОП₆₀₀ = 0.05. Культивировали при 28°C с аэрацией 140 об./мин на протяжении 6 сут. При этом каждые 24 ч измеряли ОП₆₀₀ и готовили серию разведений, после чего производили высевы на среду ПДА для определения количества колониеобразующих единиц. Степень стабильности инсерции определяли посредством пересева колоний на среду ПДА с добавлением канамицина (25 мкг/мл).

Определение эффективности биodeградации нафталина. Для каждой культуры были подготовлены колбы с одинаковым объемом среды и ОП₆₀₀ добавленных ночных культур, в количестве, равном числу отбора проб для определения в них концентрации нафталина, т.к. проведение экстракции приводит к утрате исследуемого субстрата. Экстрагировали нафталин из культуральной жидкости, для чего в колбу добавляли 0.5 объема экстрагента — перхлорэтилена. Закрывали колбу резиновой крышкой и встряхивали на протяжении 2 мин. Выдерживали 30–60 мин до разделения фаз и отбирали нижнюю фракцию, содержащую нафталин, растворенный в перхлорэтилене. Полученный экстракт очищали от полярных примесей методом колоночной хроматографии с ок-

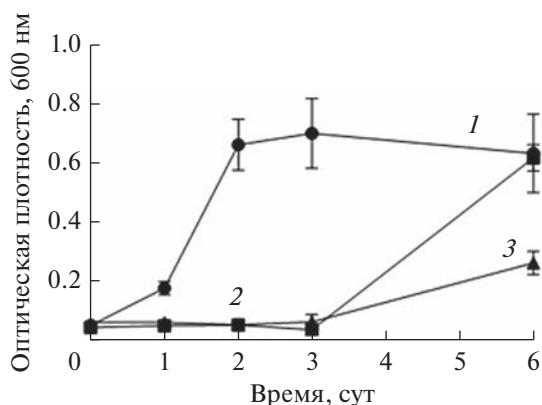


Рис. 1. Динамика роста *R. pyridinivorans* 5Ap дикого типа (wt) и мутантных вариантов по оптической плотности. (1) — wt; (2) — *narAa*⁻; (3) — *narB*⁻.

сидом алюминия. Очищенный экстракт разводили в 2–4 раза и измеряли его оптическую плотность при длине волны 312 нм. Концентрацию нафталина определяли в соответствии с калибровочным графиком. В качестве контроля использовали культуры, выращенные в среде с сукцинатом натрия (единственный источник углерода и энергии).

Обработка результатов. Для обработки данных использовали программы Microsoft Excel и GraphPad Prism. Для анализа нуклеотидной последовательности бактериальной плазмиды биodeградации нафталина *R. pyridinivorans* 5Ap использовали программу SnapGene Viewer 3.2.1 (http://www.snapgene.com/products/snapgene_viewer/) и интернет-ресурс BLAST 2.13.0 (сайт: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap являются активными деструкторами нефти и широкого спектра углеводов различных классов, в том числе ПАУ (в частности, нафталина) (Чернявская, 2018). Ранее было установлено, что гены биodeградации нафталина у этих бактерий локализованы на конъюгативной плазмиде, обозначенной как pNAPH (Чернявская, 2015). Установлено, что эта плазмида несет кластер генов *nar*, определяющий синтез ключевых ферментов начальных стадий окисления нафталина.

Характерной особенностью метаболизма ПАУ, исходя из химического строения данных соединений, является последовательная “атака” ароматических колец с последующим их преобразованием при помощи ферментов, приводящая к ступенчатому уменьшению количества колец в соединении. Также существуют различные пути, приводящие к образованию бензойной кислоты, салицилата, катехола или прокатеховой кислоты,

которые далее, с помощью соответствующих ферментов, окисляются до пирувата, оксалоацетата и ацетил-КоА, в свою очередь поступающих в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) (Vaidya, 2018).

Сущность “атаки” ароматического кольца заключается в том, что при действии фермента диоксигеназы образуется *цис*-дигидродиол, который с помощью дегидрогеназы преобразуется в *цис*-диол (в рамках одного ароматического кольца, представленного в ПАУ). После этих превращений фермент диоксигеназа, расщепляющая ароматическое кольцо, размыкает цикл через разрушение соседних С–С связей, и дальнейшие реакции деградации ПАУ осуществляются в зависимости от типа исходного соединения, поскольку для разных представителей ПАУ характерны различные метаболические пути.

Таким образом, основными ферментами окисления ПАУ можно назвать диоксигеназы, гидроксилирующие ароматическое кольцо ПАУ; дегидрогеназы и диоксигеназы, расщепляющие ароматические кольца (Cerniglia, 1993; Biodegradative Bacteria..., 2014).

В связи с этим мы провели поиск данных диоксигеназ на плазмиде pNAPH бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap и обнаружили шесть диоксигеназ, гидроксилирующих ароматическое кольцо, и одну диоксигеназу, расщепляющую ароматическое кольцо (табл. 3). Как видно из табл. 3, большинство выявленных диоксигеназ обнаруживается в клетках бактерий рода *Rhodococcus*, за исключением β-субъединицы диоксигеназы коричневой кислоты (№ 4, табл. 3), которая проявляет высокую степень сходства с последовательностями бактерий рода *Microbacterium*. Таким образом, можно сказать, что в формировании плазмиды pNAPH имели место процессы рекомбинации с фрагментами ДНК, приобретенными от бактерий других родов путем горизонтального переноса.

Среди выявленных в составе плазмиды pNAPH генов диоксигеназ ключевую роль биodeградации нафталина играет нафталиндииоксигеназа (*NarAaAb*). Следует, однако, отметить, что зачастую для диоксигеназ, окисляющих ПАУ и другие субстраты, характерна широкая субстратная специфичность (Сазыкин, 2009). Кроме того, известен нафталинутилизирующий штамм *Rhodococcus* sp. p52 (Yang et al., 2014), который обладает крайне сходным с исследуемыми бактериями геномом, за исключением *nar*-локуса, что говорит о существовании альтернативных путей утилизации нафталина. Изучение мутантов *R. pyridinivorans* 5Ap, дефектных по ключевым генам биodeградации нафталина (в частности *narAa* и *narB*), позволяет определить, могут ли другие диоксигеназы заместить их в этом процессе.

Динамику роста и эффективность биodeградации нафталина мутантными вариантами по генам

Таблица 3. Диоксигеназы, кодируемые плазмидными генами rNAPH бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap

№	Название продукта (длина, а/к; мол. масса, кДа)	Координаты гена, п.н.	Содержание Г + Ц, %	Сходные нуклеотидные последовательности (степень сходства в %, № в базе данных NCBI)	Сходные аминокислотные последовательности (% идентичности, % сходства с учетом синонимических замен, № в базе данных NCBI)
Диоксигеназы, гидроксиллирующие ароматическое кольцо					
1	Большая субъединица нафталиндиоксигеназы (<i>narAa</i>) (468 а/к; 52.6 кДа)	51 785—53 191	64	<i>Rhodococcus ruber</i> (99.64%, KY072804.1)	<i>Rhodococcus opacus</i> (99.34%, 96%, WP_005253622.1)
2	β-Субъединица диоксигеназы гидроксиллирующей ароматическое кольцо (<i>narAb</i>) (172 а/к; 19.7 кДа)	53 195—53 713	62	<i>Rhodococcus ruber</i> (100%, KY072804.1)	<i>Rhodococcus opacus</i> (98.84%, 100%, WP_005253626.1)
3	β-Субъединица диоксигеназы коричневой кислоты (203 а/к; 23 кДа)	123 696—124 307	62	<i>Rhodococcus ruber</i> (93.14%, CP023714.1)	<i>Nocardia farcinica</i> (97.04%, 100%, WP_195060669.1)
4	β-Субъединица диоксигеназы коричневой кислоты (195 а/к; 22.1 кДа)	197 508—198 095	64	<i>Microbacterium sediminis</i> (100%, CP038257.1)	<i>Microbacterium laevaniformans</i> OR221 (76.88%, 100%, EIC07797.1)
5	β-Субъединица диоксигеназы гидроксиллирующей ароматическое кольцо (167 а/к; 19.7 кДа)	132 803—133 306	64	<i>Rhodococcus</i> sp. (99.21%, CP016820.1) <i>Terrabacter</i> sp. (99.01%, AP008980.1)	<i>Rhodococcus</i> sp. p52 (98.80%, 100%, WP_019287416.1)
6	α-Субъединица диоксигеназы гидроксиллирующей ароматическое кольцо (443 а/к; 49.6 кДа)	133 303—134 634	62	<i>Rhodococcus</i> sp. (99.47%, CP016820.1)	<i>Rhodococcus</i> sp. p52 (99.32%, 100%, WP_019287415.1)
Диоксигеназы, расщепляющие ароматическое кольцо					
7	Экстрадиол-диоксигеназа (290 а/к; 30.7 кДа)	130 613—131 485	65	<i>Rhodococcus</i> sp. (99.54%, AB181125.1) <i>Gordonia terrae</i> (99.08%, CP049836.1)	<i>Rhodococcus</i> sp. YK2 (99.66%, 100%, BAC00806.1)

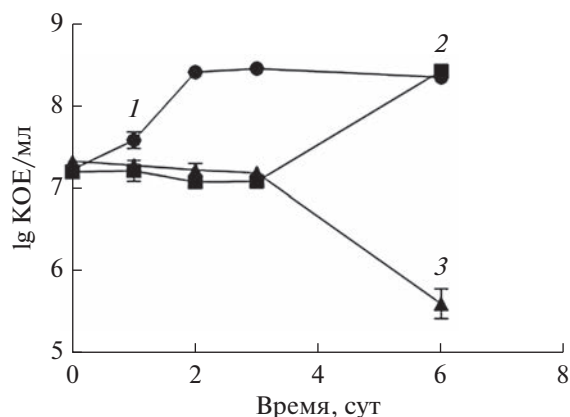


Рис. 2. Динамика роста *R. pyridinivorans* 5Ap дикого типа (wt) и мутантных вариантов по титру КОЕ (для удобства представлен в виде десятичного логарифма от значения титра клеток, lg КОЕ/мл). (1) – wt; (2) – *narAa*⁻; (3) – *narB*⁻.

narAa и *narB* изучали в сравнении с бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap дикого типа. Мутанты и бактерии дикого типа культивировали в минеральной среде К с добавлением нафталина (500 мкг/л) в качестве единственного источника углерода (рис. 2).

Интерес к изучаемым детерминантам обусловлен тем, что ген *narAa* кодирует большую субъединицу нафталиндиоксигеназы. Это ключевой фермент биodeградации нафталина; следовательно, рост мутантного варианта на среде с добавлением нафталина будет означать наличие в геноме *R. pyridinivorans* 5Ap других ферментных систем, осуществляющих первичное окисление нафталина. Продукт гена *narB*, цис-нафталиндигидродiolдегидрогеназа, действует в промежутке между диоксигеназой, гидроксилирующей ароматическое кольцо, и диоксигеназой, расщепляющей

ароматическое кольцо. Следовательно, рост мутантного варианта будет означать, что нет необходимости в такой подготовке субстрата для действия диоксигеназы, расщепляющей ароматическое кольцо (Mohapatra, Phale, 2021).

Таким образом, мы провели сравнительный анализ динамики роста мутантных вариантов по генам *narAa* и *narB* по сравнению с бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap дикого типа на среде с добавлением нафталина (500 мкг/л) в качестве единственного источника углерода и энергии (рис. 1, 2). На рис. 1 и 2 видно, что бактерии с инактивированными генами *narAa* и *narB* имеют характер роста, значительно отличающийся от роста *R. pyridinivorans* 5Ap дикого типа.

Что касается варианта, мутантного по гену *narAa*, здесь наблюдается выраженная и продолжительная лаг-фаза (2–2.5 сут), характерная для дикого типа экспоненциальная фаза, после которой практически сразу наступает фаза отмирания. С одной стороны, активный рост в промежутке между третьими и шестыми сутками может быть связан с наличием в геноме альтернативных детерминант деградации нафталина. Однако, поскольку все мутантные варианты были получены в ходе инсерционного мутагенеза, в ходе эксперимента отслеживали стабильность передачи и сохранность инсерции (табл. 4).

Сопоставив данные из рис. 1 и 2 и табл. 4 можно наиболее объективно оценить причину специфического характера роста *R. pyridinivorans* 5Ap *narAa*::pK18mob. Начиная с 3 сут стабильность инсерции начала уменьшаться и к 6 сут составляла $38.5 \pm 16.3\%$. Именно в этот промежуток времени мы отметили рост культуры. Таким образом, он был связан с исключением инсерции и восстановлением целостности гена, кодирующего нафталиндиоксигеназу, а не с присутствием в геноме иных систем, экспрессия которых занимает больше времени.

В случае с мутантом по гену *narB*, к 6 сут наблюдали $80.0 \pm 20.0\%$ выросших на среде с канамицином (25 мкг/мл) колоний, что дает основания исключить взаимосвязь повышения показателей оптической плотности и дестабилизации инсерции, инактивирующей данный ген. Кроме того, данные о титре клеток (рис. 2) говорят о наступлении фазы отмирания.

Следует отметить, что при культивировании мутантного варианта по гену *narB* мы регистрировали интенсивную желто-оранжевую окраску среды между третьими и шестыми сутками. Эта окраска сохранялась даже при выделении нафталина из культуральной жидкости и влияла на оптическую плотность. В то же время после очистки окрашенного экстракта методом колоночной хроматографии экстракт становился прозрачным. Это указывает на присутствие неспецифи-

Таблица 4. Стабильность сохранения инсерции в генах *narAa* и *narB*

Время, сут	% устойчивых к канамицину колоний		
	5Ap*	5Ap <i>narAa</i> ::pK18mob	5Ap <i>narB</i> ::pK18mob
0	0	99.3 ± 0.8	99.8 ± 0.4
1	0	96.8 ± 0.4	98.2 ± 0.8
2	0	99.0 ± 0.7	99.5 ± 0.5
3	0	81.3 ± 22.2	97.0 ± 2.9
6	0	38.5 ± 16.3	80.0 ± 20.0

* Высев дикого типа на среду ПДА с канамицином (25 мкг/мл) производили для контроля возникновения спонтанных мутантов.

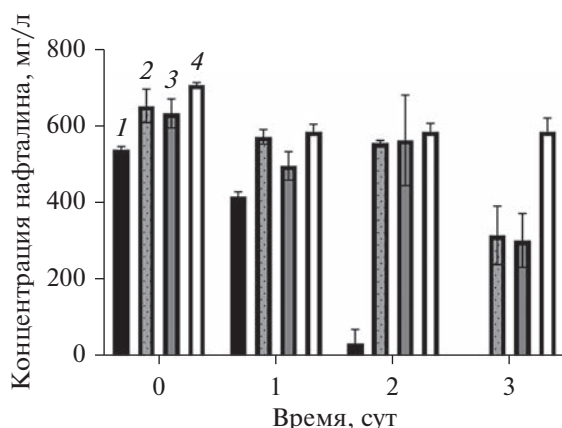


Рис. 3. Динамика утилизации нафталина бактериями *R. pyridinivorans* 5Ar дикого типа (wt) и мутантными вариантами. (1) – wt; (2) – *narAa*⁻; (3) – *narB*⁻; (4) – контрольные пробы, не содержащие бактерий.

ческого окисления первичных метаболитов нафталина с образованием полярного продукта. Желтое окрашивание может также свидетельствовать о накоплении продуктов мета-расщепления или быть связанным с утечкой активных форм кислорода из активных центров ферментов, что способствует образованию свободных радикалов, которые могут участвовать в окислении промежуточных метаболитов и приводить к накоплению тушковых продуктов (Расимович, 2019).

Определение эффективности процесса биodeградации нафталина бактериями *R. pyridinivorans* 5Ar (рис. 3) позволило установить, что на третьи сутки в среде с бактериями *R. pyridinivorans* 5Ar дикого типа (wt) нафталин не детектировался. Таким образом, в течение 3 сут был утилизирован нафталин в концентрации 500 мг/л, что в 5000 раз превышает ПДК нафталина в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования и в 125000 раз – в воде водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение (природные воды) (ГОСТ 16106-2019).

Эффективность утилизации нафталина мутантными бактериями *R. pyridinivorans* 5Ar *narAa*::pK18mob и 5Ar *narB*::pK18mob можно охарактеризовать как очень низкую, а падение концентрации нафталина в среде к 3 сут можно объяснить как исключением инсерции (справедливо для мутанта по гену *narAa*), так и естественным испарением данного углеводорода.

Таким образом, в клетках бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar нафталиндиоксигеназа (в частности, большая субъединица *NarAa*) и *цис*-нафталиндиоксидаза (*NarB*), кодируемые плазмидой pNAPH, являются ключевыми ферментами биodeградации нафталина, которые не имеют аналогов. При этом инсерционная инактивация гена *narAa* в селективных условиях (в

присутствии нафталина) оказывается обратимой: на 3 сут происходит исключение инсерции и восстановление способности бактериями утилизировать нафталин; чего не наблюдается для гена *narB*. При инактивации гена *narB* наблюдается накопление в среде окрашенного полярного продукта, экстрагируемого перхлорэтиленом. Интенсивный процесс отмирания бактерий (рис. 3) после накопления данного продукта говорит о его токсичности, а также о важности стадии, катализируемой *цис*-нафталиндиоксидазой для последующего расщепления интермедиатов нафталина.

Бактерии *R. pyridinivorans* 5Ar дикого являются высокоэффективными деструкторами нафталина, которые в течение 3 сут утилизуют данное соединение в концентрации 500 мг/л, что в 5000 раз превышает ПДК нафталина в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования и в 125000 раз – в воде водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение (природные воды). Следовательно, исследуемые бактерии могут быть использованы для эффективной очистки водных экосистем, загрязненных нафталином.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований и Министерства образования Республики Беларусь (грант Б22МВ-029), а также в рамках задания 3.6.2 ГПНИ “Биотехнологии”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают, что конфликты интересов отсутствуют.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Каталог штаммов региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов / Под ред. Ившиной И.Б.. М.: Наука, 1994.
- Catalog of Strains of the Regional Profiled Collection of Alkanotrophic Microorganisms / Ed. Ivshina I.B. M.: Nauka, 1994.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Пер. с англ. под ред. Баева А.А., Скрыбина К.Г. М.: Мир, 1984. 479 с. *Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 p.

- Нафталин коксохимический. Технические условия: ГОСТ 16106–2019. введ. 01.03.20. Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2019. 12 с.
- Расимович Б.Э. Биodeградация нефтезагрязнений под воздействием углеводородоокисляющих микроорганизмов // НефтеГазoХимия. 2019. № 1. С. 48–51.
- Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных вод. М.: Наука, 1974. 194 с.
- Сазыкин И.С., Сазыкина М.А., Чистяков В.А. Разложение нефти микроорганизмами. Экологические аспекты // Известия ВУзов. Северо-Кавказский регион. 2009. № 6. С. 88–92.
- Хант Дж. Геохимия и геология нефти / Пер. с англ. под ред. Вассоевича Н.Б., Архипова А.Я. М.: Мир, 1982.
- Hunt J. Petroleum Geochemistry and Geology. W.H. Freeman & Co, San Francisco, CA, 1979.
- Чернявская М.И., Букляревич А.А., Делеган Я.А., Охремчук А.Э., Филонов А.Е., Титок М.А. Биоразнообразие почвенных углеводородоокисляющих бактерий из разных климатических зон // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 581–594.
- Chernyavskaya M.I., Buklyarevich A.A., Delegan Ya.A., Okhremchuk A.E., Filonov A.E., Titok M.A. Biodiversity of soil hydrocarbon-oxidizing bacteria from different climatic zones // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 699–711.
- Чернявская М.И. Характеристика штаммов нафталинутилизующих бактерий рода *Rhodococcus* // Труды БГУ: Микробиология. 2016. Т. 11. Ч. 1. С. 190–197.
- Chernyavskaya M.I. Characterization of strains of naphthalene-utilizing bacteria of the genus *Rhodococcus* // Proceedings of BSU: Microbiology. 2016. V. 11. Part 1. P. 190–197.
- Biodegradative Bacteria: How Bacteria Degrade, Survive, Adapt, and Evolve / Eds. Nojiri H., Tsuda M., Fukuda M., Kamagata Y. Springer Tokyo, 2014. 358 p.
- Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection // BioTechniques. 1987. V. 5. P. 376–378.
- Cerniglia C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons // Curr. Opin. Biotechnol. 1993. V. 4. P. 331–338.
- Gennaro P.D. Identification and characterization of genes involved in naphthalene degradation in *Rhodococcus opacus* R7 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 87. P. 297–308.
- Haritash A.K., Kaushik C.P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review // J. Hazard. Mater. 2009. V. 169. P. 1–15.
- Inaba T. Analysis of genes for succinoyl trehalose lipid production and increasing production in *Rhodococcus* sp. strain SD-74 // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. P. 7082–7090.
- Kimura N. Genetic and biochemical characterization of the dioxygenase involved in lateral dioxygenation of dibenzofuran from *Rhodococcus opacus* strain SAO101 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 73. P. 474–484.
- Kulakov L.A. Web-type evolution of *Rhodococcus* gene clusters associated with utilization of naphthalene // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 1754–1764.
- Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Bioremediation of contaminated environments using *Rhodococcus* // Biology of *Rhodococcus*. Microbiology Monographs / Ed. Alvarez H. Springer, Cham. 2019. V. 16. P. 231–270.
- Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen Ch.C.R. Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility // Curr. Opin. Biotechnol. 2005. V. 16. P. 282–290.
- Li J.L., Chen B.H. Surfactant-mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons // Materials. 2009. V. 2. P. 76–94.
- Metcalf W.W., Jiang W., Wanner B.L. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6Kgamma origin plasmids at different copy numbers // Gene. 1994. V. 138. P. 1–7.
- Mohapatra B., Phale P.S. Microbial degradation of naphthalene and substituted naphthalenes: metabolic diversity and genomic insight for bioremediation // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. V. 9. Art. 602445.
- Schäfer A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* // Gene. 1994. V. 145. P. 69–73.
- te Riele H., Michel B., Ehrlich S.D. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 2541–2545.
- Vaidya S. Degradation of chrysene by enriched bacterial consortium // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 1333.
- Yang H. Degradation of recalcitrant aliphatic and aromatic hydrocarbons by a dioxin-degrader *Rhodococcus* sp. strain p52 // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2014. V. 21. P. 11086–11093.

Analysis of the Key Determinants of Naphthalene Degradation by *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap

A. Yu. Larchenka¹, * and M. I. Mandryk¹

¹Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

*e-mail: larch.alina@gmail.com

Received January 6, 2023; revised February 21, 2023; accepted March 1, 2023

Abstract—Wild-type cells of *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap were found to be highly efficient naphthalene degraders, completely utilizing this compound (500 mg/L) after 3 days, and may be used for remediation of naphthalene-contaminated aquatic ecosystems. Inactivation of the biodegradation genes *narAa* (encoding the large subunit of naphthalene dioxygenase) and *narB* (encoding *cis*-naphthalene dihydrodiol dehydroge-

nase) resulted in the loss of ability to use naphthalene as the sole energy source, which indicated the absence in the genome of *R. pyridinivorans* 5Ap of the determinants responsible for alternative pathways of naphthalene oxidation. Moreover, *narB* inactivation resulted in accumulation of a polar colored compound (probably a product of primary naphthalene oxidation) in the medium.

Keywords: naphthalene biodegradation, *Rhodococcus*, biodegradation genes, growth dynamics, biodegradation efficiency, dioxygenase